

Über die strahleninduzierte Aggregation von Ribonuclease

von

Winfried Sigmund Ernst Hierl

aus

Weiden

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543128_0028

Aus dem Institut für Radiologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. nat. H. Pauly

Über die strahleninduzierte Aggregation von Ribonuclease

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg**

**vorgelegt
von
Winfried Sigmund Ernst Hierl
aus
Weiden**

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereiches Medizin

der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 27. September 1976

INHALTSÜBERSICHT

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Einleitung	1
1.2. Problemstellung	4

2. Experimenteller Teil

2.1. Materialien und Geräte	5
2.1.1. Materialien	5
2.1.2. Geräte	6
2.2. Methoden	7
2.2.1. Allgemeines	7
2.2.2. Bestrahlung	7
2.2.2.1. Versuchsanordnung	7
2.2.2.2. Dosisleistung	10
2.2.3. Messung der Enzymaktivität	10
2.2.3.1. Prinzip	10
2.2.3.2. Durchführung	13
2.2.3.3. Auswertung der Meßdaten	13
2.2.4. Dosis-Effekt-Kurven	14
2.2.5. Gelchromatographie	15
2.2.5.1. Prinzip	15
2.2.5.2. Durchführung	16
2.2.5.3. Auswertung der Chromatographiekäufe	18
2.2.5.4. Abschätzung des Molekulargewichtes	18
2.2.6. UV-Differenzspektren	19

3. Ergebnisse

3.1. Bestrahlung unter N_2	20
3.1.1. Wahl der Bestrahlungsbedingungen	20
3.1.2. Dosis-Effekt-Kurven	21
3.1.3. Gelchromatographie	22
3.1.3.1. Elution nativer RNase über G-75 und G-200	22
3.1.3.2. Proteinkonzentration und Verteilung der enzymatischen Aktivität	24
3.2.3.3. Aggregation in Abhängigkeit von der Dosis	27
3.2. Bestrahlung unter N_2O	29
3.2.1. Wahl der Bestrahlungsbedingungen	29
3.2.2. Gelchromatographie	30
3.2.2.1. Proteinkonzentration und Verteilung der enzymatischen Aktivität	30
3.2.2.2. Aggregation in Abhängigkeit von der Dosis	31
3.2.2.3. Aggregation in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bei konstanter Dosis	35
3.2.2.4. Aggregation in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bei konstanter Inaktivierung	36
3.2.2.5. pH-Einfluß auf das Elutions- verhalten	40
3.2.3. Veränderung nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Zeit	42
3.2.3.1. Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit	43

3.2.3.2. Spektren in Abhängigkeit von der Zeit	44
3.2.3.3. Chromatogramme in Abhängig- keit von der Zeit	48
<u>4. Diskussion</u>	49
<u>5. Zusammenfassung</u>	65
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	66

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Einleitung

Mit der Entdeckung der biologischen Wirksamkeit ionisierender Strahlen um die Jahrhundertwende, beispielsweise ihrer cancerogenen Eigenschaften, erwuchs aus der Beobachtung solcher Phänomene das Interesse, die dabei ablaufenden Vorgänge näher zu untersuchen.

In der nun folgenden ersten Periode der Strahlenbiologie führte man überwiegend Untersuchungen durch, die den Endpunkt der biologischen Schadensentwicklung testeten, wie etwa die Empfindlichkeit verschiedener Gewebe gegenüber ionisierender Strahlen oder die Abtötung einer Mäusepopulation als Funktion von der verabreichten Dosis.

Es erwies sich jedoch sehr bald, daß es auf diese Weise unmöglich war, genaueren Einblick in die dabei ablaufenden physikalischen, chemischen und biologischen Vorgänge zu gewinnen, da diese Systeme zu viele nicht meßbare und auf komplexe Weise zusammenwirkende Parameter enthalten und zudem alle Reaktionsschritte unterhalb der molekularen Ebene durch den Stoffwechsel des bestrahlten Organismus beeinflußt werden.

Mit der Entwicklung der modernen Biochemie ergab sich die Möglichkeit, die Komplexität biologischer Prozesse in ein System molekularer, biochemischer Reaktionen aufzulösen. So lag es nahe, die strahleninduzierten Veränderungen ebenso auf molekularer Ebene zu untersuchen; es entstand das Gebiet der molekularen Strahlenbiologie.

Besonderes Interesse fand die Strahlenreaktion von Enzymen, da sie für die Aufrechterhaltung der Lebensprozesse elementare Funktionen erfüllen. Die Vorstellung, Strahlenschäden eines lebenden Organismus über strahleninduzierte Veränderungen an Enzymen und damit durch Alteration des Stoffwechsels erklären zu können, erwies sich jedoch als falsch,

benötigt man doch für eine merkliche Inaktivierung von Enzymen Dosen im Bereich von mehreren krd, während z.B. die LD_{50} (30 die) für den menschlichen Organismus bei Ganzkörperbestrahlung ca. 400 rd beträgt. Dennoch erwies sich die Bestrahlung von Enzymen als geeignetes Modell, weil einmal Enzyme hochgereinigt dargestellt werden können und es zum anderen relativ einfach ist, die Wirkung von ionisierenden Strahlen an Hand von Änderungen der Enzymaktivität zu untersuchen.

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten der Bestrahlung: Bestrahlung trockener Systeme oder wässriger Lösungen. Im ersten Fall findet die Absorption von Strahlenenergie im selben Molekül statt, in dem auch die Schädigung auftritt. Man spricht von direkter Strahlenwirkung. Im zweiten Fall erfolgen Energieabsorption und Wirkung in verschiedenen Molekülen. Dies bezeichnet man als indirekte Strahlenwirkung.

In dieser Arbeit wurden nur wässrige Enzymlösungen bestrahlt. Es kommt dabei primär zur Radiolyse des Wassers. Die dabei entstehenden, sehr reaktionsfähigen Produkte, $H^{\bullet}$ -, $OH^{\bullet}$ -Radikale und solvatisierte Elektronen e_{aq}^- faßt man unter dem Begriff Wasserradikale zusammen. Mit Hilfe der Methode der Pulsradiolyse (1) kann man die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion dieser diffusiblen Radikale mit Biomolekülen messen. Durch Zugabe von Radikalfängern ist es möglich, die Wirkung einer einzigen Radikalspezies genauer zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Bestrahlung von Ribonuclease (RNase). RNasen kommen in allen Geweben vor, insbesondere auch im Pankreassekret. Die Rinderpankreas-RNase A ist ein sehr gut untersuchtes Enzym. RNase katalysiert den Abbau von Ribonucleinsäuren (siehe 2.2.3.1.). Die Aminosäuresequenz ist bereits seit 1960

bekannt (2). Das Enzym besteht aus 124 Aminosäuren, die eine Peptidkette bilden. An vier Stellen ist diese Kette durch Disulfidbrücken verknüpft (3) (Abb. 1). Das Molekulargewicht beträgt 13 580.

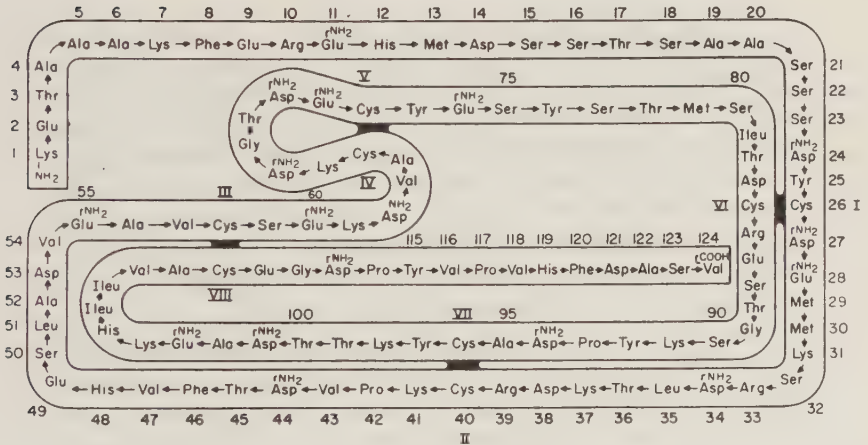


Abb. 1 Aminosäuresequenz der Rinderpankreas-RNase A. Die Positionen der Disulfidbrücken sind schwarz gekennzeichnet.

Die Aufklärung der räumlichen Struktur gelang Kartha et al 1967 (4).

Zahlreiche biochemische Arbeiten (5) beschäftigen sich mit Struktur und Funktion der RNase, so daß eine Vielzahl von Denaturierungsvorgängen bei diesem Enzym bekannt ist.

1.2. Problemstellung

Bei der Einwirkung von ionisierenden Strahlen auf eine wässrige RNase-Lösung findet man neben der Inaktivierung sehr häufig - wie bei anderen Denaturierungsprozessen - eine Vergrößerung der Enzymmoleküle (6). Diese veränderten Moleküle lassen sich durch Säulenchromatographie über Dextrangele abtrennen.

Diese Vergrößerung kann man deuten als Aggregation, Entfaltung oder als Kombination beider Effekte.

Bisher wurden die Gelfiltrationen der bestrahlten RNase über engmaschige Gele durchgeführt, so daß die Aggregate als eine Fraktion von den monomeren Enzymfraktionen getrennt im Ausschlußvolumen (siehe 2.2.5.1.) erschienen.

In dieser Arbeit sollte versucht werden, diese Aggregate durch Chromatographie über einem Gel mit höherem Trennbereich weiter aufzutrennen und die Größenverteilung dieser Aggregate in Abhängigkeit von der Dosis und der Enzymkonzentration zu untersuchen. Weiterhin sollten die Enzymaktivität im Aggregat bestimmt und Dosis-Effekt-Kurven aufgenommen werden. Nach Mee et al. (7) werden Aggregate durch die Reaktion der $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikale bewirkt. Daher wurde der überwiegende Teil der Bestrahlungen unter N_2O vorgenommen, um den Einfluß von $\text{OH}^{\bullet}$ -Radikalen auf die Aggregation untersuchen zu können.

2. Experimenteller Teil

2.1. Materialien und Geräte

2.1.1. Materialien

Folgende Materialien und Chemikalien wurden verwendet:

- Ribonuclease A⁽¹⁾ aus Rinderpankreas Typ III-A, chromatographiert, 90 - 95% homogen, 100 Kunitz U/mg,
- Ribonucleinsäure⁽²⁾ aus Hefe, Typ XI; Sigma Chemical Company, St. Louis, USA,
- Cytidin - 2', 3' - Cyclophosphat⁽³⁾, Bariumsalz; Merck, Darmstadt,
- Sephadex G-75 und G-200,
- Blue Dextran 2000; Pharmacia, Uppsala, Schweden,
- Marinon,
- Incidin; Henkel GmbH, Düsseldorf,
- Hibitane; Imperial Chemical Industris,

alle übrigen Chemikalien; Merck, Darmstadt.

Das verwendete Wasser war entionisiert und zweimal quartzdestilliert.

Abkürzungen:

- (1) RNase
 - (2) RNA
 - (3) CCP
-

2.1.2. Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

- Therapie-Röntgenröhre TR 300 f; Siemens, Erlangen,
- Spektralphotometer PMQ II; Carl Zeiss, Oberkochen,
- Quarz-Infrasil- und -Suprasil-Küvetten, Schichtdicke 1 cm; Hellma, Mühlheim,
- YSI - Model 42 SC Telethermometer; Yellow Springs, USA,
- Thermostat FE mit Kontaktthermometer; Gebr. Haake, Berlin,
- Optilab-Analog-Digital-Wandler Multilog 801,
- Optilab Printer Driver 833,
- Optilab Elektronik Timer 825; Optilab und Bo Philip, Instrumentation AB Vällingby, Schweden,
- Teleprint 390; Teleprint GmbH, Eschborn,
- pH-Meter 26 und 27,
- Titrator 11,
- Autobürette ABU 12,
- Titrigraph; Radiometer, Copenhagen,
- Mikropipetten Marburg; Eppendorf Gerätebau, Hamburg,
- Elektrische Magnetprüfgeräte JKA-Combimag; Janke und Kunkel, Staufen,
- Chromatographieröhre aus Plexiglas; nach Plan angefertigt von Herrn Lehmeier, Institut für Radiologie, Erlangen,
- Ultro-Rac-Fraktionensammler LKB 7000; LKB Producter, Bromma, Schweden,
- Colora Kühltruhe für Ultro-Rac LKB 7000; Colora Meßtechnik, Lorch,
- Isco-UA 5-Durchflußphotometer mit Schreiber; Instrumentation Specialities Company, Lincoln, USA,
- Calculator 9100 A; Hewlett Packard, Loveland, USA,

- Kälte-Thermostat Ultra Kryomat TK 30 D; Wobser, Lauda,
- Spektralphotometer Model 24; Beckman Instruments, Fullerton, USA.

2.2. Methoden

2.2.1. Allgemeines

Alle Versuche wurden unter möglichst keimarmen Bedingungen durchgeführt, da eine Kontamination des Gels mit Mikroorganismen eine Erhöhung der Basislinie und nicht reproduzierbare Extinktionswerte zur Folge hatte. Gefäße, Pipetten, Schläuche und Magnetrührer wurden mit 70%igem Propanol desinfiziert.

Die Chromatographiesäulen wurden vor der Füllung mit Laborreiniger RBS 50 gesäubert, mit 70%igem Propanol desinfiziert, anschließend mit sterilem Aqua dest. gespült und sofort mit Gel gepackt. Die Gelsuspension und sämtliche Elutionspuffer wurden 20 Minuten bei 120° C autoklaviert. In den Benutzungspausen wurde dem Eluanten ein Bakteriostatikum (0,02% Na-azid oder 0,002% Hibitane) zugegeben. Der Chromatographieraum wurde mit UV-Licht ausgeleuchtet und von Zeit zu Zeit mit Incidin gereinigt.

2.2.2. Bestrahlung

2.2.2.1. Versuchsanordnung

Bestrahlt wurden jeweils 10 ml Lösung unterschiedlicher Enzymkonzentration. Die Proteinlösung befand sich in einem Quarztöpfchen, das mit einem Kühlmantel versehen und in einem Plexiglastopf eingelassen war. Oberhalb des Flüssigkeitsspiegels befanden sich seitlich zwei Öffnungen: eine für die Zuleitung von Gasen (N_2 , N_2O), die andere für die

Probenentnahme zur Messung von Dosis-Effekt-Kurven. Nach oben zur Röhre hin war der Topf mit einer 0,03 mm starken Hostaphanfolie abgeschlossen. Der Bestrahlungstopf stand auf einem Magnetrührgerät, da während der Zuleitung des Gases und während der Bestrahlung die Lösung langsam gerührt wurde (Abb. 2).

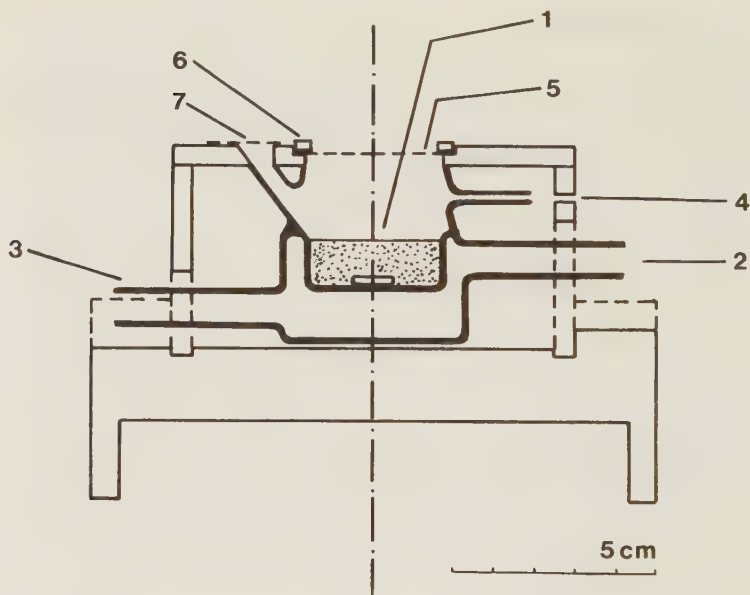
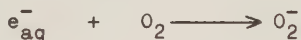


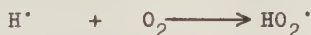
Abb. 2 Bestrahlungsgefäß im Schnitt.
Es bedeuten:

- 1 = Quarztöpfchen mit Probe und Rührer,
- 2 = Kühlmittel abfluß, 3 = Kühlmittel-
- zufluß, 4 = Gaszuleitung, 5 = Hostaphan-
- folie, 6 = Klemmring, 7 = Öffnung für Proben-
- entnahme und Gasausleitung.

Der Kühlmantel aus Wasser und der Plexiglasblock schützten vor einer Rückstrahlung von den Metallteilen des Magnetrührgerätes. Der Durchmesser des Töpfchens war so bemessen, daß die bestrahlte Schichtdicke 1 cm betrug. Die Lösung wurde auf 1,5° C gekühlt, so daß eine thermische Denaturierung ausgeschlossen war. Stickstoff (N₂) wurde 2 Stunden, Distickstoffoxid (N₂O) 1 1/2 Stunden vor Bestrahlungsbeginn und während der Bestrahlung über die Lösung geleitet. Bei Überleitung von N₂ wird Sauerstoff (O₂) aus der Proteinlösung verdrängt. Der O₂-Gehalt der Lösung betrug bei Bestrahlungsbeginn weniger als 5 · 10⁻⁵ M O₂, während die Lösung unter Luft 3 · 10⁻³ M O₂ enthielt (8). O₂ reagiert besonders schnell mit solvatisierten Elektronen.



Weiterhin kann O₂ mit H[·]-Radikalen reagieren (9).



Auf diese Weise entstehen bei Bestrahlung unter O₂ zwei neue Radikale, die das System noch unübersichtlicher machen. Um dies zu verhindern wurde O₂ mittels N₂ verdrängt. Bei Bestrahlung unter N₂O läuft bei der Radiolyse des Wassers folgende Reaktion ab (10):



Unter dieser Versuchsbedingung kann man somit die Wirkung von OH[·]-Radikalen bei der Inaktivierung untersuchen.

2.2.2.2. Dosisleistung

Die Bestrahlung erfolgte mit einer Röntgenröhre Stabilipan 300 der Fa. Siemens. Die Röhrenspannung betrug 200 kV, der Röhrenstrom 20 mA bei einer Eigenfilterung von 2 mm Al. Der effektive Abstand vom Fokus betrug 124 mm. Die Dosisleistung wurde auf zwei Arten bestimmt.

- physikalisch⁽¹⁾ (Ionisationskammer)
- chemisch⁽²⁾ (Fricke-Dosimetrie)

Beide Verfahren ergaben eine Dosisleistung von 2490 rd/min. In der Arbeit von Zahn (11) finden sich detaillierte Angaben zur Fricke-Dosimetrie.

2.2.3. Messung der Enzymaktivität

2.2.3.1. Prinzip

RNase katalysiert die Spaltung von RNA, die in zwei Schritten erfolgt (Abb. 3):

1. Eine schnelle Reaktion im Sinne einer Transphosphorylierung, wobei es zu einer partiellen Depolymerisation der RNA kommt. Dabei wird die zum C-Atom 5' gehende Esterbindung auf die 2'-Hydroxylgruppe übertragen, so daß eine zyklischer Diester entsteht. Diese Reaktion ist spezifisch. C₅'-O-P Bindungen werden nur nach Pyrimidinbasen (Cytidin, Uridin) und nicht nach Purinbasen (Adenosin, Guanosin) gespalten. Die Purinnukleosid-3'-phosphodiestergruppen sind gegen RNase resistent.

(1) Die physikalische Bestimmung führten Herr Dr. Th. Schmidt und Herr Dr. P. Milbers,

(2) die chemische Bestimmung Frau Dr. H. Schüssler durch.

2. Eine langsame Reaktion im Sinne einer Hydrolyse des intramolekularen Diesters zur 3'-Monophosphatverbindung. 1. wird als Depolymerase-, 2. als Hydrolaseaktivität der RNase bezeichnet.

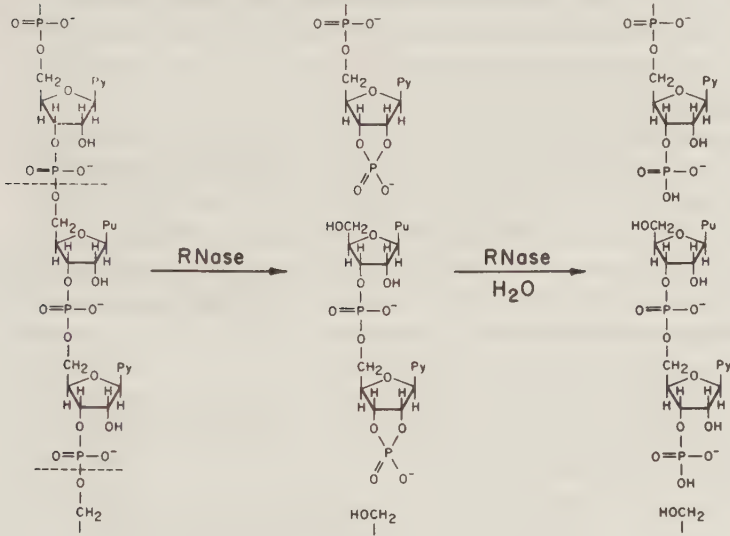


Abb. 3 Wirkung von RNase auf RNA.

Pyrimidin- und Purinbasen sind mit Py bzw mit Pu bezeichnet.

Da bekannt ist, daß die Depolymerase- und die Hydrolaseaktivität bei Modifikationen am Enzymmolekül oft unterschiedlich stark betroffen sind (5), wurden immer beide Aktivitäten gemessen.

Alle gebräuchlichen Methoden der Aktivitätsbestimmung beruhen auf dem Reaktionsschema von Abb. 3 und benutzen RNA bzw. synthetisches CCP (bzw. Uridin-2', 3'-Cyclophosphat) als Substrat.

Depolymeraseaktivität:

Während des ersten Reaktionsschrittes kommt es infolge der Depolymerisation zu einer Konformationsänderung der RNA-Kette. Als Folge dieser Spaltung von RNA tritt eine Extinktionsabnahme bei 300 nm auf. Diesen Effekt deutet man als Abnahme von Streulicht. $-\Delta E_{300}/t$ ist ein direktes Maß für die Enzymaktivität. Dieses Meßverfahren wurde von Kunitz entwickelt (12).

Hydrolaseaktivität:

Sie wurde titrimetrisch bestimmt, da diese Methode genauer ist als die ebenfalls mögliche spektralphotometrische Bestimmung (5).

Da die pK-Werte der primären und sekundären Phosphatgruppen ungefähr 1 bzw. 6 betragen (5), kommt es während des 2. Reaktionsschrittes (Hydrolyse) zur Freisetzung eines Protons und damit zu einer Abnahme des pH-Wertes. Das dabei freigesetzte Säureäquivalent wird titrimetrisch durch Zugabe von Lauge bestimmt, wobei die zur Neutralisation nötige Menge an Lauge ein direktes Maß für die Enzymaktivität ist.

2.2.3.2. Durchführung

Depolymeraseaktivität:

Sie wurde nach der von Potts et al. (13) angegebenen Methode bestimmt. Dabei wird die Extinktionsabnahme bei 300 nm einer 0,1%igen RNA-Lösung in 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 5,0 bei 30° C gemessen. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von jeweils 100 μ l Enzymlösung zu 3 ml Substratlösung. Die Meßwerte wurden unter Verwendung eines Multilog-Instruments in digitaler Form ausgegeben und gleichzeitig mit einem Teletype auf Lochstreifen übertragen. Die Meßintervalle wurden so gewählt, daß sich zwischen zwei Meßwerten ungefähr ein $\Delta E_{300} = 0,005$ ergab.

Hydrolaseaktivität:

Zur Anwendung kam die Methode von Richards und Vitahayathil (14). Als Substrat wurde eine 0,2%ige Lösung von CCP in 0,3 M NaCl pH 7,0 verwendet. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von jeweils 50 μ l Enzymlösung zu 2 ml Substratlösung. Die Titration der freiwerdenden Säuregruppen erfolgte mit dem Autotitrator im pH-stat unter N₂ bei 30° C mit NaOH (ca. 0,002 N) unter Aufzeichnung einer Titrationskurve. Vor und nach jeder Versuchsreihe wurde die Normalität der Lauge durch Titration von 0,001 N HCl bestimmt und aus beiden Werten ein Mittelwert ermittelt.

2.2.3.3. Auswertung der Meßdaten

Aus den auf Lochstreifen gespeicherten Meßdaten wurde von einem Rechner mit einem Fortran-Programm für die lineare Regression der Wert für $\Delta E_{300}/s$ berechnet. Der Fehler

dieser Bestimmung lag unter 4% ⁽¹⁾. Als Maß für die Aktivität der Hydrolasefunktion wurde die zur Aufrechterhaltung des pH's verbrauchte Alkalimenge pro Minute aus der Titrationskurve bestimmt. Der Fehler dieser Methode lag unter 2%.

2.2.4. Dosis-Effekt-Kurven

Für die Dosis-Effekt-Kurven wurden in zeitlich gleichmäßigen Abständen 150 μ l Proben aus dem Bestrahlungsgefäß entnommen. Die Proben wurden in 0,3 M NaCl pH 7,0 derart verdünnt, daß 100 μ l der Enzymverdünnung etwa 5 - 7 μ g RNase enthielten. Aus den gemessenen Werten der enzymatischen Aktivitäten wurde in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit (Dosis) eine exponentielle Kurve der Form

$$A(t) = A(0) e^{-bt}$$

unter Benutzung einer linearen Regressionsmethode ermittelt.

Dabei sind: $A(t)$ = enzym. Aktivität in %

t = Bestrahlungszeit in Minuten

$A(0)$ = Aktivität des unbestrahlten Enzyms in %

b = Inaktivierungsgeschwindigkeit
als Aktivität (%) / Bestr.zeit (min)

⁽¹⁾ Die mathematische Auswertung der Daten führte in dankenswerter Weise Herr Dipl.-Ing. G. Oetken vom Institut für Nachrichtentechnik durch.

Den Wert für die D_{37} ($A(t) = \frac{A(0)}{e}$) erhält man aus dem reziproken Wert von b multipliziert mit der Dosisleistung. Diese Berechnungen erfolgten mit Hilfe eines Hewlett-Packard-Rechners 9100 A.

2.2.5. Gelchromatographie

2.2.5.1. Prinzip

Die bestrahlten Enzymlösungen wurden der Gelfiltration über Sephadex G-75 bzw. G-200 unterworfen.

Sephadex ist ein modifiziertes Dextran, dessen Polysaccharidketten zu einem dreidimensionalen Netzwerk verknüpft sind. Sein stark hydrophiler Charakter beruht auf dem hohen Gehalt an Hydroxylgruppen. Es kommt daher in Wasser und Elektrolytlösungen zu einer starken Quellung der Gelperlen.

Das gequollene Gel befindet sich in einem Rohr, dessen Gesamtvolumen sich aus drei Teilvolumina zusammensetzt:

- dem Maschenwerk der Polysaccharidketten aus denen ein Gelkörnchen besteht,
- den von Lösungsmittel (Phosphatpuffer) erfüllten Hohlräumen innerhalb der Gelkörner,
- den ebenfalls von Puffer erfüllten Lücken zwischen den Gelperlen.

Der durch die Lücken fließende Puffer stellt die mobile Phase des Systems dar, Maschenwerk und Hohlräume bilden die stationäre Phase. Schematisch läßt sich eine Trennung wie folgt beschreiben:

Kleinen Molekülen ist das gesamte Hohlraumsystem der Gelperlen zugänglich. Je größer dagegen ein Molekül ist, desto kleiner ist der Anteil am Hohlraumsystem, in den es

ungehindert diffundieren kann. Hieraus folgt, daß gerade die kleinsten Moleküle bei der Säulenpassage am stärksten verzögert werden und das größte Durchlaufvolumen (Elutionsvolumen, V_e) erforderlich ist, um sie ganz durch die Säule zu befördern, weil sie sich länger und in größerer Zahl dem Weitertransport in der mobilen Phase durch Diffusion in die stationäre Phase entziehen.

Es erfolgt somit eine Trennung des Substanzgemisches in Fraktionen, wobei abnehmender Molekülgröße ein zunehmenden Elutionsvolumen zugeordnet ist. Alle Moleküle, die nicht in die Gelmatrix eindringen können, werden als Fraktion im V_0 (outer volume, Ausschlussvolumen) eluiert. V_0 entspricht der Summe der Lücken zwischen den Gelkörnchen; Die Bestimmung erfolgte mittels Elution von Blue Dextran 2000.

2.2.5.2. Durchführung

Die Chromatographiesäulen bestanden aus zwei konzentrisch angeordneten Plexiglasrohren. Das äußere bildete den Kühlmantel, das innere war mit Gel gepackt. Die Abmessungen des Gelbettes betrugen 193 x 1,4 cm. Die Verschlußzylinder am Säulenein- und Säulenausgang bestanden aus Hartplastik, die mit einem Polyacrylsieb versehen waren, um ein Eindringen der Gelpartikel in die Teflonschläuche zu verhindern. Zusätzlich wurden zur Verbesserung der Strömungsgeschwindigkeit mit einem Steckring noch ein Kunststoffraster und eine Glasfasermatte an den Verschlußzylindern befestigt. Detaillierte konstruktive Angaben finden sich in der Arbeit von Kunigk (8).

Um eine gute Trennschärfe und hohen Durchfluß zu erzielen, wurden die Dextrangele G-75 bzw. G-200 sorgfältig vorbereitet. Zunächst wurde das abgewogene Trockengel nach der Empfehlung des Herstellers (15) in eine genügende Menge von Aqua dest. eingerührt. Die Suspension von G-200 wurde

nur kurz und langsam gerührt, um eine Beschädigung der weichen Gelmatrix zu verhindern. Nach Sedimentation wurden die noch im Überstand suspendierten Gelpartikel abgesaugt; das entsprechende Volumen an Aqua dest. ergänzt und wieder aufgerührt. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt. Die Quellzeit bei Raumtemperatur betrug für G-75 mindestens 24 Stunden für G-200 3 Tage. Anschließend wurde das Gel 20 Minuten bei 120° C autoklaviert.

Vor der Füllung wurde die Säule je zweimal mit 70%igem Propanol und sterilem Aqua bidest. gespült. Bei geschlossenem Auslauf wurde die entgaste Gelsuspension entlang eines Kunststoffstabes eingefüllt. Ein aufgesetzter Trichter nahm überschüssiges Gel auf und diente als Pufferreservoir. Zur Sedimentation des Gelbettes erfolgte der Pufferdurchfluß zunächst absteigend, wobei über einen Zeitraum von einigen Tagen der Druck kontinuierlich gesteigert wurde, bis der maximale Arbeitsdruck erreicht war. Er betrug für G-75 160 cm H₂O, für G-200 16 cm H₂O (15).

Bei Absinken des Gelbettes wurde der Verschlußzylinder soweit nachgedrückt, bis er wieder mit der Geloberfläche abschloß. Anschließend wurde die Säule gedreht und der Vorgang analog wiederholt. Auf diese Weise wurden gleichmäßige Gelpackungen mit hoher Durchflußrate erzielt.

Vor der ersten Trennung wurde mit 500 ml Elutionsmittel äquilibriert. Eluiert wurde jeweils mit 10⁻² M Phosphatpuffer pH 7,0. Zusätzlich wurden einige Auftrennungen bei Elution mit 0,01 N HCl wiederholt. Nach Angaben der Hersteller bleibt das Gel in 0,02 N HCl mindestens 6 Monate stabil.

Sämtliche Puffer waren steril und wurden vorher entgast. Sie hatten Raumtemperatur (ca. 22° C), während das Gelbett selbst auf 4° C gekühlt wurde. Die bestrahlten Enzymlösungen wurden sofort nach Bestrahlungsende aufgetragen, da beim längeren Stehen die Extinktion zunahm, was auf eine Nachreaktion schließen ließ (siehe 3.2.3.).

Die Durchflußraten betrugen - je nach Alter der Säule - bei G-75 12-24 ml/h, bei G-200 8-12 ml/h.

Bei Befall des Gels mit Mikroorganismen wurde solange mit 0,002% Hibitane- und 0,02% Na-azidlösung eluiert, bis eine Agarplatte mit einigen Tropfen des Eluats keinen bakteriellen Wuchs mehr zeigte. Anschließend mußte neu äquilibriert werden.

2.2.5.3. Auswertung der Chromatographieläufe

Das Eluat wurde in einer Kühltruhe bei 4° C in Portionen zu jeweils 45 Tropfen (Fraktionsgröße = 3 ml) aufgefangen. Die Extinktion der einzelnen Fraktionen wurde bei 280 nm gegen den Elutionspuffer gemessen. Im Elutionsdiagramm wurde die Position der Proteinpeaks mit ihrer Fraktionsnummer - gerechnet von Beginn des Probenauftrags - markiert. Bei einigen Auftrennungen wurde zusätzlich die Extinktion mit einem Isco-Durchflußphotometer fortlaufend registriert.

2.2.5.4. Abschätzung des Molekulargewichts

Zur Abschätzung des Molekulargewichtes der Elutionspeaks nach Bestrahlung diente der von Determann (16) angegebene lineare Zusammenhang zwischen dem relativen Elutionsvolumen V_e/V_o globulärer Proteine und dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes:

$$\log MG = 5,624 - 0,752 \frac{V_e}{V_o}$$

Dabei sind: V_e = Elutionsvolumen
 V_o = Ausschlußvolumen
MG = Molekulargewicht

Diese Gleichung gilt für Auftrennungen über Sephadex G-75 und ist unabhängig von den Säulenabmessungen. Mittels bekannten V_0 (Bestimmung mit Blue Dextran 2000) sowie V_e läßt sich rechnerisch das MG der Elutionspeaks ermitteln.

2.2.6. UV-Differenzspektren

Die Spektren wurden mit einem automatischen Spektralphotometer der Fa. Beckmann aufgenommen. Die bestrahlte Enzymlösung wurde im Bereich von 360-240 nm sowohl gegen native RNase als auch gegen Puffer gemessen.

3. Ergebnisse

3.1. Bestrahlung unter N₂

3.1.1. Wahl der Bestrahlungsbedingungen

Entsprechend der Problemstellung der Arbeit wurden beim Bestrahlen unter N₂ folgende Parameter gewählt, um eine möglichst hohe Aggregatausbeute zu erreichen:

1. Hohe Enzymkonzentration: 3 mg/ml

Kunigk (8) und Niemczyk (17) hatten bei Bestrahlung des Enzyms Lactatdehydrogenase (LDH) gefunden, daß bei gleicher Dosisleistung die Ausbeute an Aggregat mit zunehmender Enzymkonzentration ansteigt.

2. "Dünner" Bestrahlungspuffer: 10^{-3} M Phosphatpuffer pH 7,0

Bei Vergleich der Ergebnisse von Denkl (18) und Kunigk (8), die wässrige LDH-Lösung bestrahlt hatten, ergab sich, daß die Aggregation bei sonst identischen Bestrahlungsbedingungen von der Ionenstärke des verwendeten Puffers abhängig war. Bei höherer Ionenstärke nahm der Anteil an Aggregat ab. Sie erklärten das damit, daß im Aggregat offenbar elektrostatische Bindungen existieren und höhere Ionenstärken zu einer teilweisen Aufhebung dieser stabilisierenden Bindungen führen.

3. Hohe Dosis: 400 krd

Die Aggregation ist bei konstanter Enzymkonzentration umso stärker, je höher die verabreichte Dosis ist (8).

3.1.2. Dosis-Effekt-Kurven

Die Strahlenempfindlichkeit einer RNase-Lösung unter den angegebenen Bedingungen, das heißt die verbliebene enzymatische Aktivität als Funktion von der Dosis zeigt Abb. 4.

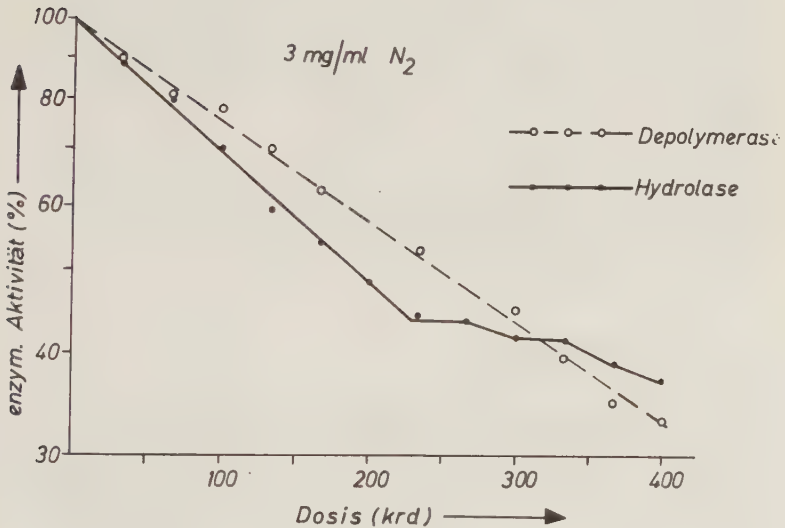


Abb. 4 Abhängigkeit der RNase-Aktivitäten von der verabreichten Dosis in % der Aktivität nativer RNase.

Aufgetragen sind die Mittelwerte aus drei Versuchen.

Die Depolymeraseaktivität zeigte mit zunehmender Dosis eine exponentielle Abnahme. Der Wert für die D_{37} betrug 300 krd. Die Hydrolasefunktion war unter diesen Bedingungen strahlenempfindlicher als die Depolymerasefunktion. Die Hydrolaseaktivität zeigte nur bis zu einer Dosis von 230 krd einen gleichmäßigen exponentiellen Abfall. Aus diesem Abschnitt der Kurve erhielt man für die D_{37} einen Wert von 280 krd. Bei höheren Dosen bog die Kurve ab, d. h. die Aktivitätsabnahme pro Dosis Einheit wurde geringer. Es ergab sich jetzt für die D_{37} ein Wert von 400 krd. Dieser Effekt wurde mehrmals gemessen.

Die Vermutung, daß bei dieser Dosis die Aggregatbildung praktisch abgeschlossen ist, konnte jedoch nicht bestätigt werden (siehe Abb. 7). Dieses Ergebnis könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

3.1.3. Gelchromatographie

3.1.3.1. Elution nativer RNase über G-75 und G-200

Da es aus Platzgründen nicht möglich war, in den folgenden Elutionsdiagrammen jeweils native RNase zum Vergleich einzuzuichnen, sei das Elutionsverhalten unbestrahlter RNase bei Trennung über G-75 und G-200 vorangestellt. Die wesentlichen Daten ergeben sich aus Abb. 5, über die Bedeutung von V_0 und V_e siehe 2.2.5.1.

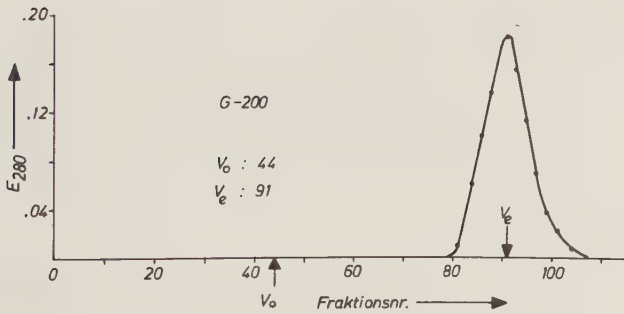
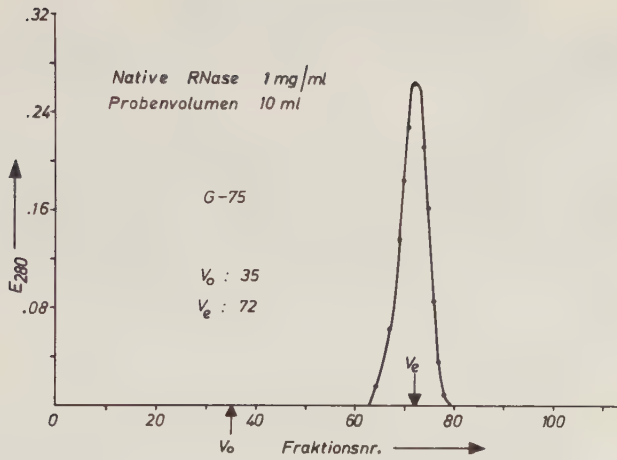


Abb. 5 Elutionsdiagramme nativer RNase bei Trennung über Sephadex G-75 und G-200.

3.1.3.2. Proteinkonzentration und Verteilung der enzymatischen Aktivitäten

Die bestrahlten Enzymlösungen wurden der Gelfiltration über G-75 unterworfen und die Verteilung der Aktivitäten gemessen.

Wie Abb. 6 zeigt, lassen sich nach einer Dosis von 400 krd mit dieser Methode drei Gruppen von Teilchen unterscheiden. Die Zusammensetzung der auftretenden Peaks sei exemplarisch an diesem Chromatogramm dargestellt. Für die folgenden Chromatogramme ist sie analog.

III Fraktion 32-55:

Teilchen mit mehrfachem Molekülvolumen von nativer RNase. Der größte Teil erscheint im Ausschlußvolumen V_0 , hat also ein scheinbares Molekulargewicht $> 74\ 000$ (16).

II Fraktion 55-65:

Teilchen mit zweifachem Molekülvolumen von nativer RNase. Es kann sich um entfaltete Moleküle und kleinere Aggregate oder um dimere RNase handeln. Für Dimeres ergibt sich ein Elutionswert von Fraktion 56-57 (16).

I Fraktion 65-80:

Moleküle, die an gleicher Position wie unbestrahlte RNase eluiert werden, also ihre ursprüngliche Größe behalten haben.

Kleinmolekulare Bestandteile, die langsamer als native RNase wandern, wie sie Haskill und Hunt (19) bei Auftrennung von reduzierten Proben bestrahlter RNase fanden, traten nicht auf.

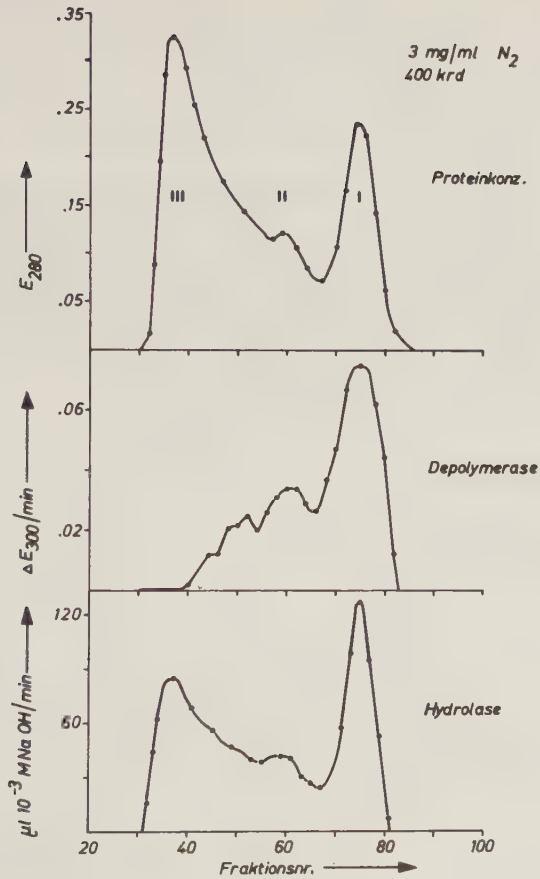


Abb. 6 Gelchromatographie über G-75 mit Verteilung
der Enzymaktivitäten.

Eine quantitative Aussage über die Enzymaktivitäten in den einzelnen Peaks, bezogen auf 100% Aktivität des nativen Enzyms, stößt auf folgende Schwierigkeit:

Unbestrahlte und bestrahlte Probe wiesen eine deutliche Extinktionsdifferenz auf (siehe 3.2.3.). Unter diesen Bedingungen war $E_{278} = 2,10$ vor und $E_{278} = 2,31$ nach Bestrahlung.

Es kommt offenbar zu einer Änderung des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} , so daß sich die Proteinkonzentration in den einzelnen Fraktionen nicht mehr feststellen läßt. Unter der Annahme, daß diese Änderung für alle drei Gruppen gleich groß ist, kann man jeweils die Verhältnisse Aktivität/ E_{280} bilden und sie miteinander vergleichen. Es ergeben sich folgende Relationen zwischen den drei Gruppen:

$$\frac{\text{Hydrolaseaktivität}}{E_{280}} \quad \text{III : II : I} = 0,5 : 0,66 : 1$$

$$\frac{\text{Depolymeraseaktivität}}{E_{280}} \quad \text{III : II : I} = 0,12 : 0,93 : 1$$

Die Hydrolaseaktivität ist in Gruppe III und II etwa halb so hoch wie in Gruppe I. Die Depolymeraseaktivität beträgt für Gruppe III nur noch ca. 1/10 der Aktivität der Gruppe I. Gruppe II zeigt dagegen gegenüber Gruppe I kaum einen Aktivitätsverlust.

Die Tatsache, daß im Aggregat (III) die Depolymeraseaktivität sehr gering, die Hydrolaseaktivität dagegen noch relativ hoch ist, stimmt gut mit den Ergebnissen anderer Autoren überein (20).

Für die Gruppe I der großemäßig unveränderten Moleküle ergeben sich für die zwei möglichen Grenzfälle - ϵ_{280} erhöht, ϵ_{280} konstant - folgende Aktivitätswerte in % des unbestrahlten Enzyms:

	Hydrolase	Depolymerase
ϵ_{280} konst.	43 %	59 %
$\epsilon_{280} >$	47 %	65 %

Die Unterschiede sind relativ gering, da die Extinktionszunahme unter diesen Bedingungen nach Bestrahlung nur 10% betrug.

Auf jeden Fall ist sicher, daß es auch in der Gruppe I zu einer Inaktivierung kommt, die jedoch bemerkenswerterweise an keine Molekülvergrößerung gebunden ist. Gleiche Ergebnisse fanden Niemczyk (17) und Kunigk (8) bei Bestrahlung von LDH.

Mit der Gelfiltration lassen sich somit zwei Prozesse an der strahlendenaturierten RNase nachweisen:

Eine Schädigung des Moleküls, die zur Abnahme der Aktivitäten führt und eine Vergrößerung der Moleküle.

Da das Aggregat bei Auftrennung über G-75 überwiegend im Ausschlußvolumen V_0 eluiert wird, wurde für weitere Untersuchungen auch über einem Gel mit größerem Trennbereich - G-200 - eluiert.

3.1.3.3. Aggregation in Abhängigkeit von der Dosis

Die Ergebnisse der Auftrennungen von wässrigen RNase-Lösungen unter den angegebenen Bedingungen über G-75 und G-200 zeigt Abb. 7.

Die Trennungen über G-75 ergeben, daß das Ausmaß der Aggregation bei konstanter Enzymkonzentration eine Funktion der verabfolgten Dosis ist. Bei Steigerung der Dosis von 250 krd auf 400 krd kommt es unter Abnahme der Gruppen I und II zu einer Zunahme der Gruppe III. Der Abfall des Elutionspeaks der Gruppe III ist relativ flach, ein Hinweis dafür, daß möglicherweise keine Fraktion einheitlicher Molekülgröße vorliegt.

Zur Klärung wurde deshalb über G-200 aufgetrennt.

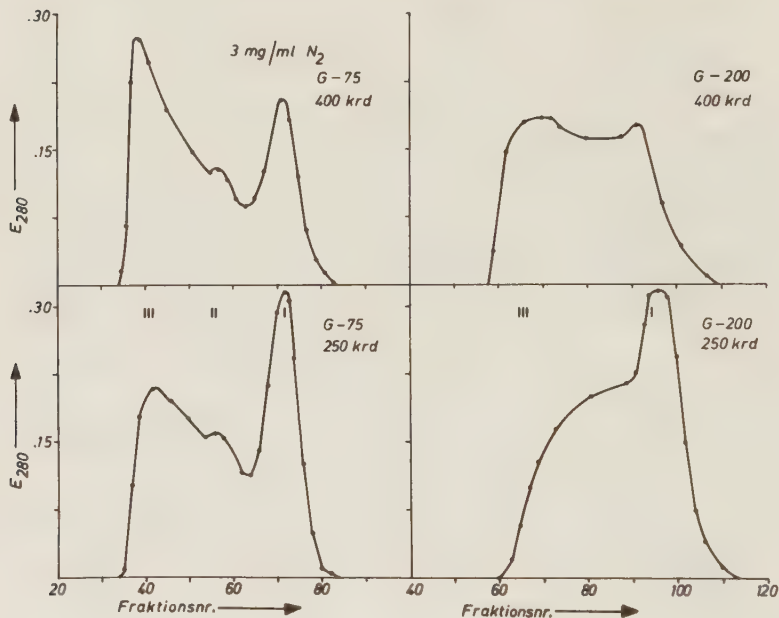


Abb. 7 Elutionsdiagramme bei Trennung über G-75 und G-200. Dosen 250 krd, 400 krd.

Es lassen sich zwei Gruppen unterscheiden (Abb. 7):

III repräsentiert wie bei G-75 Aggregat. Es kann gezeigt werden, daß sich das Aggregat nicht aus definierten Untereinheiten von Vielfachen nativer RNase - Dimeren, Trimeren usw. - zusammensetzt, sondern aus einem Gemisch von Molekülen verschiedener Größe besteht.

I besteht aus Teilchen, die durch die Bestrahlung keine Größenveränderung erfahren haben.

Peak II läßt sich offenbar wegen des geringen MG-Unterschiedes zu nativer RNase ($\Delta \text{MG} = 13600$) infolge des großen Trennbereiches von G-200 ($\text{MG } 5\,000 - 800\,000$) nicht isolieren.

Analog den Trennungen über G-75 zeigt sich, daß die Aggregatausbeute eine Funktion der Dosis ist. Die Verschiebung des Elutionsanfangs um vier Fraktionen nach links bei einer Dosis von 400 krd gegenüber 250 krd beweist außerdem, daß es darüber hinaus mit zunehmender Dosis zu einer Volumenvergrößerung der Moleküle im Aggregat kommt.

3.2. Bestrahlung unter N_2O

3.2.1. Wahl der Bestrahlungsbedingungen

Prinzipiell gelten die Überlegungen von 3.1.1. mit folgender Ausnahme:

Wegen der starken Aggregatbildung bei Bestrahlung unter N_2O infolge der gebildeten $\text{OH}^\bullet$ -Radikale (10),



wurden nur RNase-Lösungen einer Konzentration 1 mg/ml in 10^{-3} M Phosphatpuffer bestrahlt. Bei höheren Enzymkonzentrationen führten schon geringe Dosen zu einem Ausfall des Enzyms (Trübung der Lösung), so daß die bestrahlten Proben nicht mehr chromatographiert werden konnten.

Untersucht wurden die Verteilung der enzymatischen Aktivität, das Ausmaß der Aggregation in Abhängigkeit von der Dosis und der Enzymkonzentration, sowie der pH-Einfluß auf das Elutionsverhalten.

3.2.2. Gelchromatographie

3.2.2.1. Proteinkonzentration und Verteilung der enzymatischen Aktivität

Die Ergebnisse der Auftrennung über G-75 bei einer Dosis von 100 krd sind in Abb. 8 dargestellt

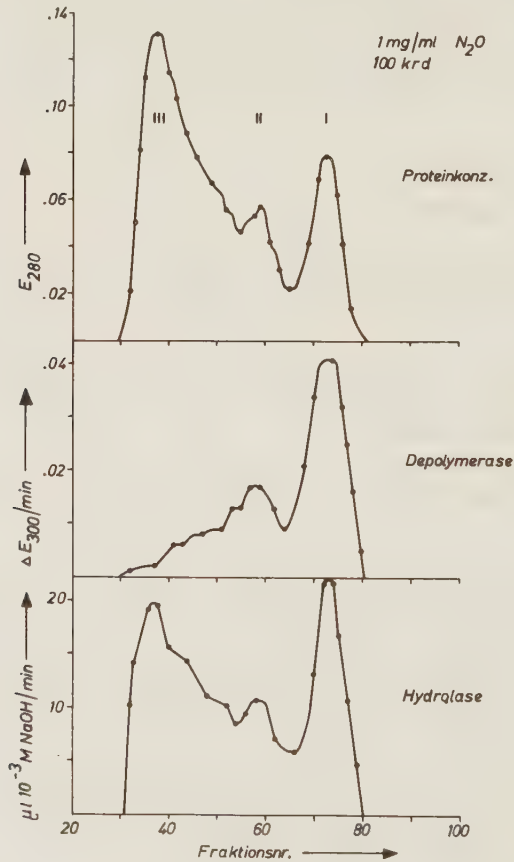


Abb. 8 Gelchromatographie über G-75 mit Verteilung der Enzymaktivitäten.

Zur Interpretation mögen die Feststellungen von 3.1.3.2. genügen, da die Diagramme trotz der unterschiedlichen Bestrahlungsbedingungen zufälligerweise nahezu identisch sind.

Wie bei Bestrahlung unter N_2 ist auch unter N_2O im Aggregat die Hydrolaseaktivität noch relativ hoch, während die Depolymeraseaktivität sehr gering ist.

3.2.2.2. Aggregation in Abhängigkeit von der Dosis

In Abb. 9 sind die Elutionsdiagramme von RNase-Lösungen konstanter Konzentration wiedergegeben, die mit verschiedenen Dosen bestrahlt wurden.

Es ergibt sich wieder, daß der Anteil der Gruppe III an den Bestrahlungsprodukten mit steigender Dosis zu Lasten der beiden anderen Gruppen zunimmt.

Daneben kommt es wieder zu einer deutlichen Verschiebung des Elutionsmaximums der Gruppe III mit zunehmender Dosis nach links:

60 krd	:	V_e III	Fraktion 52
100 krd	:	V_e III	Fraktion 42
150 krd	:	V_e III	Fraktion 38

Es kommt also genauso wie bei Bestrahlung unter N_2 mit steigender Dosis zu einer kontinuierlichen Größenzunahme der Teilchen im Aggregat.

Deutlich zu erkennen ist eine Flächenzunahme unter den einzelnen Elutionskurven mit ansteigender Dosis. Da diese Flächen ein Maß für die Gesamtmenge an Enzym darstellen, würde dem eine Zunahme an Protein entsprechen.

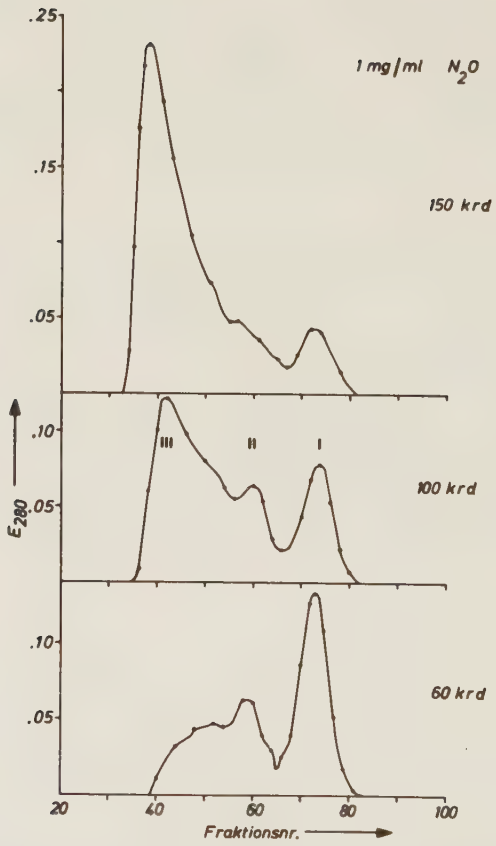


Abb. 9 Elutionsdiagramme bei Auftrennung über G-75.
Dosen 60, 100, 150 krd.

Erklären läßt sich dieser Effekt wieder mit einer Änderung des molaren Extinktionskoeffizienten infolge Bestrahlung. Ob dies nur für die Moleküle der Gruppe III und Gruppe II zutrifft oder auch für die größenmäßig unveränderten Teilchen der Gruppe I, bedarf noch der Klärung.

Die Ergebnisse der Auftrennung über G-200 bei gleichen Bedingungen (außer 250 krd statt 150 krd) sind in Abb. 10 wiedergegeben.

Ebenso wie bei Bestrahlung unter N_2 wurde gefunden:

1. Das Aggregat ist uneinheitlich und besteht aus einem Gemisch von Molekülen unterschiedlicher Größe und nicht aus definierten Untereinheiten (breite Elutionspeaks des Aggregates).
2. Die Ergebnisse der Auftrennung über G-75 (Abb. 9) - anteil- und größenmäßige Zunahme des Aggregates mit wachsender Dosis - werden bestätigt.

Bei einer Dosis von 100 krd ist wieder eine deutliche Flächenzunahme unter der Elutionskurve gegenüber 60 krd festzustellen. Nach Bestrahlung mit 250 krd wird die Fläche allerdings kleiner. Wahrscheinlich kam es bei dieser Dosis bereits zu einer teilweisen Ausfällung des Enzyms in der Chromatographiesäule, so daß daraus ein Proteinverlust resultiert.

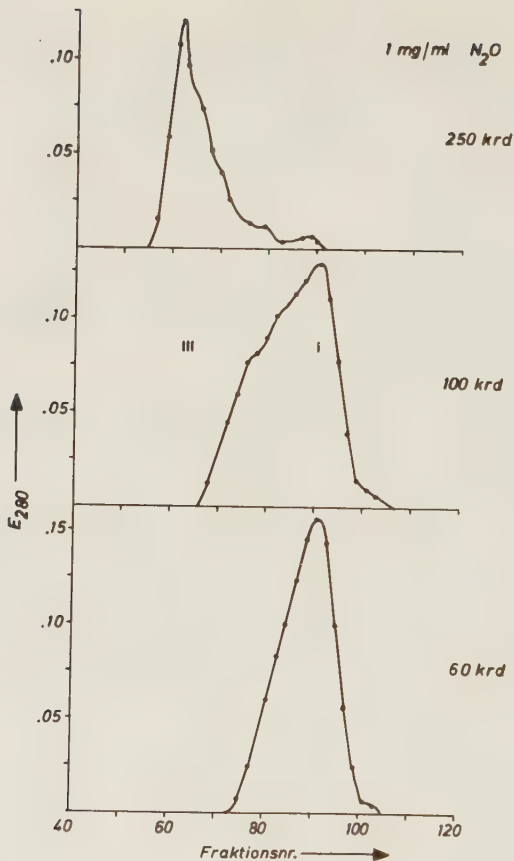


Abb. 10 Elutionsdiagramme bei Auftrennung über G-200.
Dosen 60, 100, 250 krd.

3.2.2.3. Aggregation in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bei konstanter Dosis

Dazu wurden RNase-Lösungen unterschiedlicher Konzentration mit jeweils 100 krd bestrahlt. Die Ergebnisse bei Trennung über G-75 zeigt Abb. 11.

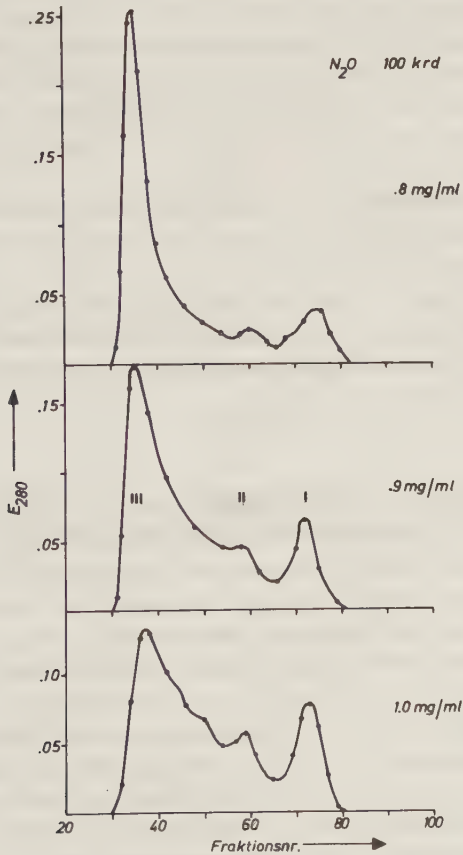


Abb. 11 Elutionsdiagramme über G-75.
Dosis jeweils 100 krd.

Mit abnehmender Enzymkonzentration kommt es zu einer kontinuierlichen Zunahme der Gruppe III zu Lasten der beiden anderen Gruppen. In qualitativer Hinsicht ergeben sich damit die gleichen Ergebnisse wie bei Bestrahlung von Proben gleicher Konzentration mit steigender Dosis. Da bei niedriger Enzymkonzentration die Inaktivierung bei gleicher Dosis sicher weiter fortgeschritten ist, könnte man einen Zusammenhang zwischen Inaktivierung und Aggregation vermuten. Für die Gruppe I konnte jedoch gezeigt werden (siehe 3.1.3.2.), daß auch hier eine Inaktivierung stattfindet, die mit keiner Molekülvergrößerung einhergeht.

Ähnliche Elutionsdiagramme bestrahlter RNase-Lösungen von unterschiedlicher Konzentration sowohl für N_2 als auch N_2O fand Schüssler (21).

Dagegen ergaben sich bei Bestrahlung von LDH-Lösungen gegenteilige Ergebnisse. Bei gleicher Dosisleistung war hier der Anteil der Gruppe III umso größer, je höher die Enzymkonzentration war (8, 17).

3.2.2.4. Aggregation in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bei konstanter Inaktivierung

Zur Bestimmung der Dosen, die bei verschiedenen Enzymkonzentrationen zu gleicher Inaktivierung d. h. zu gleichem mittleren Beschädigungsgrad der Moleküle führen, wurden zuerst Dosis-Effekt-Kurven für die Hydrolaseaktivität gemessen.

Die Inaktivierung war von der Konzentration abhängig. Je höher die Konzentration, desto geringer war der Aktivitätsverlust, der bei gleicher Dosis gemessen wurde. Die aus den Dosis-Effekt-Kurven bestimmten Werte für die D_{37} in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration zeigt Abb. 12.

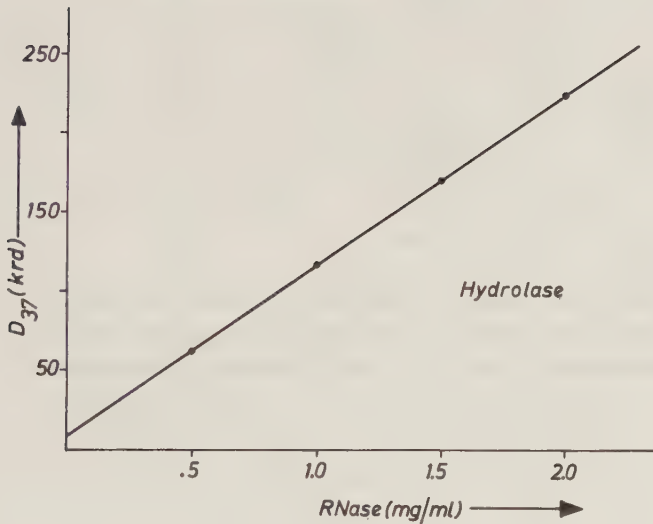


Abb. 12 D_{37} der Hydrolaseaktivität in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.
Bestrahlung unter N_2O .

Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der D_{37} und der Konzentration. Mittels einer linearen Regressionsmethode läßt sich eine Kurve der Form

$$D_{37} (c) = mc + b$$

ermitteln.

Dabei sind: D_{37} (c): Dosis, bei der noch 37%
Aktivität vorhanden ist
c : Enzymkonzentration
m, b : Konstanten

Für die Gerade aus Abb. 9 ergibt sich:

$$m = 109,6 \left[\frac{\text{krd} \cdot \text{ml}}{\text{mg}} \right]$$

$$b = 8,3 \quad [\text{krd}]$$

Für die Auftrennung über G-75 wurden die Proben solange bestrahlt, bis die Hydrolaseaktivität noch jeweils 50% des nativen Enzyms betrug. Die entsprechenden Dosen wurden aus den Dosis-Effekt-Kurven ermittelt und betrugen:

c (mg/ml)	D_{50} (krd)
0,5	45
1,0	85
2,0	168

Die Auftrennungen sind in Abb. 13 dargestellt.

Der Maßstab ist so gewählt, daß bei doppelter Enzymkonzentration jeweils die Ordinateneinheit verdoppelt wurde. Die Diagramme sind fast völlig identisch. Insbesondere läßt sich kein Unterschied am anteilmäßigen Verhältnis zwischen Gruppe III und Gruppe I feststellen. So ist auch bei einer 4-fach konzentrierteren Lösung (2 mg/ml gegenüber 0,5 mg/ml) die Aggregatausbeute nicht höher.

Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu den Ergebnissen von Delincee und Radola (22), die bei Bestrahlung von RNase-Lösungen unter Argon (entspricht N_2) bei verdünnten Lösungen weniger Aggregat gefunden hatten (siehe Diskussion).

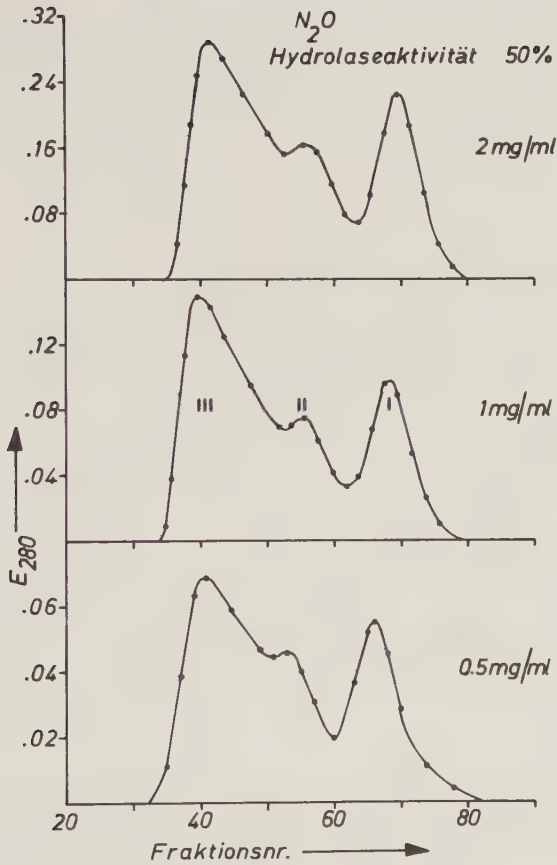


Abb. 13 Elutionsdiagramme bei Trennung über G-75.
Gleiche Inaktivierung, verschiedene Konzentrationen.

3.2.2.5. pH-Einfluß auf das Elutionsverhalten

In der Arbeit von Mee et al. (7) sind Auftrennungen von bestrahlten RNase-Lösungen über G-75 veröffentlicht. Die Versuchsbedingungen waren ähnlich denen in der hier vorliegenden Arbeit: N_2O , Enzymkonzentration 1 mg/ml in $3 \cdot 10^{-3}$ M Phosphatpuffer pH 7,5. Die geringen Unterschiede in der Ionenstärke und im pH des Bestrahlungspuffers dürften keinen Einfluß auf die Aggregation haben. Bei Vergleich der Ergebnisse von Mee et al. mit denen aus Abb. 9, 10 ergaben sich gravierende Unterschiede. Mee et al. hatten mit 10^{-2} N HCl eluiert. Es erschien daher möglich, daß das pH des Eluanten Einfluß auf das Elutionsverhalten haben könnte. Es wurden deshalb Proben, die unter gleichen Bedingungen bestrahlt worden waren, jeweils mit 10^{-2} N HCl und 10^{-2} M Phosphatpuffer eluiert. Das Ergebnis ist in Abb. 14 wiedergegeben.

1. Unbestrahlte RNase wird mit 10^{-2} N HCl unverändert eluiert (ohne Abb.).
2. Nach einer Dosis von 30 krd gleicht das Chromatogramm dem von Mee et al. Gegenüber Elution mit 10^{-2} M Phosphatpuffer ist eine Zunahme an Aggregat (III) und eine frühere Elution, d. h. eine Größenzunahme der Teilchen im Aggregat erfolgt.
3. Gravierende Unterschiede ergeben sich bei einer Dosis von 60 krd.

Bei Elution mit 10^{-2} N HCl ergibt sich eine deutliche Aggregatzunahme. Es ist hier bereits die anteilmäßig größte Fraktion. Außerdem ist wieder eine Teilchenvergrößerung (Linksverschiebung) festzustellen.

Daß es sich dabei um trimere RNase handelt, konnte nicht bestätigt werden, da sie bei Fraktion 47 eluiert werden müßte (16), während das Maximum von Peak III bei Fraktion 38 erscheint.

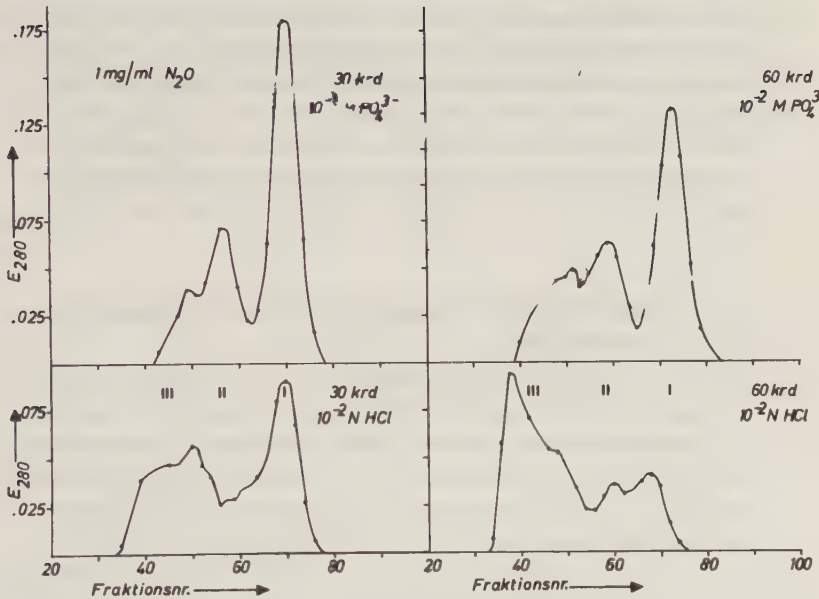


Abb. 14 Elutionsdiagramme bei Auftrennung über G-75.
Elution $10^{-2} N HCl$ bzw. $10^{-2} M$ Phosphat-
puffer.

Peak II wird unverändert bei Fraktion 60 eluiert.
Das Maximum von Peak I ist unter $10^{-2} N HCl$ um
fünf Fraktionen nach links verschoben und erscheint
bei Fraktion 67. Daraus errechnet sich ein schein-
bares MG von 15 300 (16). Es könnte sich um dena-
turierte RNase handeln. Größenmäßig unveränderte
Moleküle treten nicht mehr auf.

Auf Grund dieser Ergebnisse erscheint es als sicher, daß das pH des Eluanten das Elutionsverhalten von bestrahlten RNase-Lösungen stark verändert. Ein Hinweis dafür war auch das Blue Dextran, das normalerweise als einheitliche Fraktion im Ausschlußvolumen erscheint, bei Elution mit 10^{-2} N HCl in zwei getrennten Fraktionen eluiert wurde. Offenbar hydrolysiert unter diesen Bedingungen ein Teil ab.

3.2.3. Veränderungen nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Zeit

Bei Kontrolle der Exinktionswerte bei 278 nm der Enzym-lösungen vor und nach Bestrahlung ergaben sich beträchtliche Differenzen. So war beispielsweise bei Bestrahlung einer Lösung der Konzentration 1 mg/ml unter N_2O mit 100 krd $E_{278} = 0,71$ vor und $E_{278} = 0,98$ nach Bestrahlung. Für diesen Fall ergibt sich ein $\Delta E_{278} = 0,27$ (38%). Ray und Hutchinson (23) stellten in Differenzspektren von RNase nach Bestrahlung eine allgemeine Extinktions-erhöhung fest. Aktipis und Iammartino (24) fanden, daß sie mit steigender Inaktivierung (Dosis) zunimmt. Zufällig wurde festgestellt, daß sich E_{278} auch nach Be-strahlungsende beim Stehen der Lösung weiter erhöhte. Da es sich um einen Vorgang im Sinne einer weiteren Agg-regation handeln könnte, würde damit das Elutionsverhal-ten vom Zeitpunkt des Auftrages auf die Chromatographie-säule abhängig sein. Zur Klärung dieser Frage wurden deshalb E_{278} und Spek-tren in Abhängigkeit von der Zeit nach Bestrahlungs-ende gemessen.

3.2.3.1. Extinktion in Abhängigkeit von der Zeit

Für die folgenden Messungen wurden jeweils RNase-Lösungen der Konzentration 1 mg/ml in 10^{-3} M Phosphatpuffer unter N_2O mit einer Dosis von 85 krd bestrahlt. Die Extinktion betrug $E_{278} = 0,71$ vor und $E_{278} = 0,90$ sofort nach der Bestrahlung.

Die Extinktionsveränderung beim Stehen der Lösung nach Bestrahlung zeigt Abb. 15.

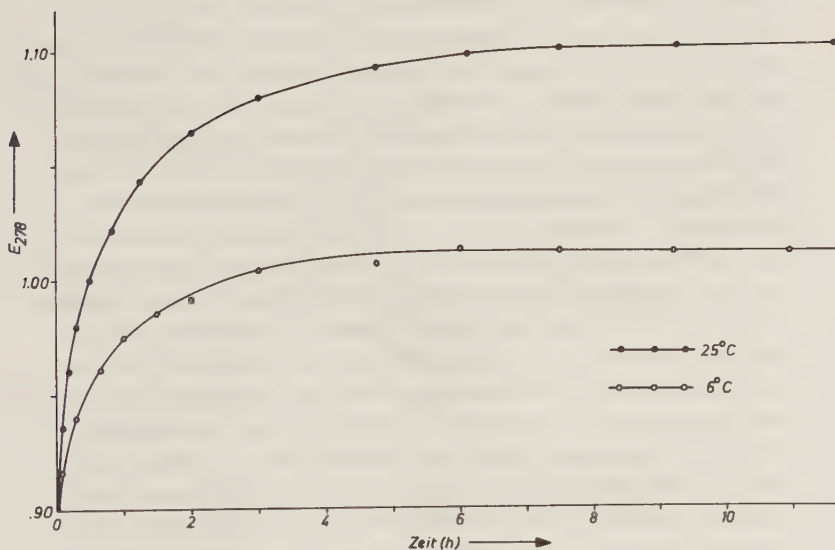


Abb. 15 E_{278} nach Bestrahlung in Abhängigkeit von der Zeit. Proben temperatur 25° C und 6° C.

Bei einer Probertemperatur von 25°C stieg E_{278} innerhalb von 12 Stunden von 0,90 auf 1,107. Die Extinktionszunahme betrug damit 0,207 und war sogar etwas höher als die Extinktionsdifferenz zwischen bestrahlter und unbestrahlter Lösung, die 0,19 betrug. Die Extinktionszunahme bei gekühlter Probe ging nur bis zu $E_{278} = 1,013$ und war schon nach 6 Stunden erreicht. Bereits nach 3 Stunden wurden 83% (25°C) bzw. 91% (6°C) des endgültigen Extinktionswertes gemessen.

3.2.3.2. Spektren in Abhängigkeit von der Zeit

Proteine besitzen die Eigenschaft UV-Licht zu absorbieren. Ihr charakteristisches Spektrum im Bereich von 240-320 nm ist vor allem bedingt durch die aromatischen Seitenketten von Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin (RNase besitzt kein Tryptophan). Viele Autoren untersuchten den Einfluß von Denaturierungsprozessen auf Differenzspektren von Proteinen. Scheraga (25) und Donovan et al. (26) führen die auftretenden Absorptionsunterschiede auf Veränderungen in der Umgebung aromatischer, chromophorer Gruppen zurück, hervorgerufen durch pH-Verschiebungen, Temperaturunterschiede oder durch den Angriff von Detergenzien. Je nach dem in welchem Ausmaß dabei innerhalb der Elektronenhüllen chromophorer Gruppen Grundzustände mit angeregten Zuständen wechseln, kann das Spektrum zu längeren ('red shift') oder kürzeren ('blue shift') Wellenlängen verschoben werden. Dabei können auch Intensitätsunterschiede auftreten (25). Beides erfaßt ein Differenzspektrum. Nach Wetlaufer (27) leisten bei denaturierten Proteinen folgende Phänomene einen Beitrag zum Entstehen von Differenzspektren: Veränderungen der Carboxylgruppenionisation, Änderung der Absorptionseigenschaften von chromophoren Gruppen und Änderungen der Proteinkonformation.

Abb. 16 zeigt vier Spektren gemessen gegen 10^{-3} M Phosphatpuffer.

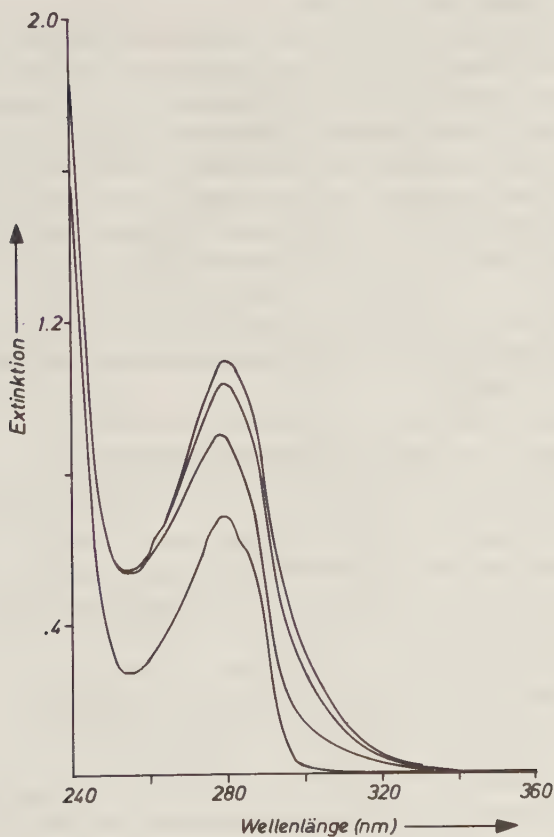


Abb. 16 UV-Spektren gegen Puffer. Von unten nach oben: native RNase, sofort, 2 Stunden, 12 Stunden nach Bestrahlungsende, Probertemperatur 25° C, RNase 1 mg/ml, 85 krd.

Gegenüber unbestrahlter RNase zeigt das Spektrum nach einer Dosis von 85 krd eine allgemeine Extinktionserhöhung und eine Verschiebung ('shift') des Maximums von 279 nm auf ca. 277,5 nm.

Die meisten Verfahren, die zur Inaktivierung von RNase führen, bedingen den gleichen shift (28). Als Erklärung wird eine Änderung der Wechselwirkung von 3 Tyrosin-OH-Gruppen mit ihrer Umgebung angegeben (29,30).

Die zwei oberen Spektren, aufgenommen 2 und 12 Stunden nach Bestrahlungsende, zeigen außer einer weiteren allgemeinen Extinktionserhöhung keine Änderung des Kurvenverlaufs. Abb. 17 zeigt Differenzspektren bestrahlter RNase.

Das Spektrum direkt nach Bestrahlung zeigt bei 256, 280 und 289 nm Minima mit korrespondierenden Maxima bei 268, 282 und 291 nm.

Beim Stehenlassen der bestrahlten Lösung ergeben sich in Abhängigkeit von der Zeit folgende Änderungen:

1. eine allgemeine Erhöhung des ΔE zu nativer RNase.
2. Die Minima bei 256 und 280 nm werden undeutlicher, ebenso das Maximum bei 268 nm. Das Maximum bei 282 nm wird der deutlichste Peak mit dem größten ΔE .

Das Minimum bei 289 nm und das dazugehörige Maximum bei 291 nm bleiben erhalten und verändern nur ihr ΔE .

Das Differenzspektrum gleicht im übrigen den Spektren, die bei anderen Denaturierungsprozessen von RNase gemessen wurden.

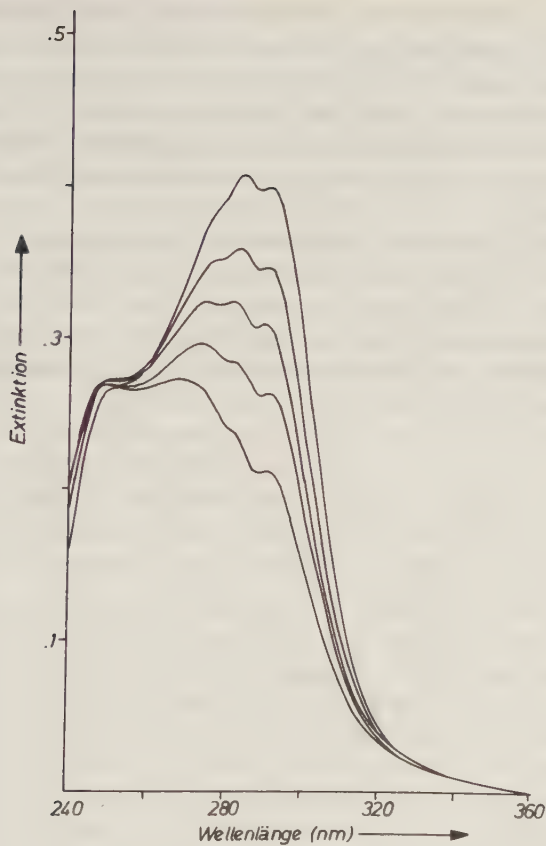


Abb. 17 UV-Differenzspektren strahlendenaturierter RNase. RNase 1 mg/ml, N_2O , 85 krd.
von unten nach oben: sofort nach, 1/2, 1, 2, 8 Stunden nach Bestrahlungsende.

3.2.3.3. Chromatogramme in Abhängigkeit von der Zeit

Bestrahlt wurden RNase-Lösungen der Konzentration 1 mg/ml mit 85 krd unter N_2O . Probe 1 wurde sofort, die Proben 2 und 3 wurden erst einen Tag nach Bestrahlung auf die Säule (G-75) aufgetragen, wobei Probe 2 während dieser Zeit auf 6° C gekühlt und Probe 3 der Raumtemperatur ausgesetzt war.

Damit war sicher (Abb. 14), daß sie verschiedene E_{278} hatten. Die Elutionsdiagramme waren völlig identisch (ohne Abb. - siehe Abb. 13 Mitte).

Damit konnte gezeigt werden, daß das Elutionsverhalten vom Zeitpunkt des Auftragens auf die Säule unabhängig ist.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Größenveränderungen, die RNase-Moleküle beim Bestrahlen in wässriger Lösung erfahren, in Abhängigkeit von den Versuchsparametern Energiedosis und Enzymkonzentration untersucht. Um über die Zusammensetzung dieser Aggregate Aufschluß zu gewinnen, wurden sie auch über G-200 aufgetrennt, da sie bei Elution über G-75 zum größten Teil als einheitliche Fraktion im Ausschlußvolumen V_0 eluiert werden.

Für diesen Zweck war es sinnvoll, möglichst viel Aggregat zu haben. Es wurden deshalb anfangs Bestrahlungsbedingungen gewählt, die nach den Ergebnissen anderer Autoren eine hohe Aggregatausbeute erwarten ließen (siehe 3.1.1.). Hohe Dosis, hohe Enzymkonzentration und ein Bestrahlungspuffer niedriger Ionenstärke.

Bei Bestrahlung von RNase-Lösungen der Konzentration 3 mg/ml in 10^{-3} M Phosphatpuffer unter N_2 zeigten die aufgenommenen Dosis-Effekt-Kurven einige Besonderheiten:

1. Die gemessenen D_{37} -Werte für die Inaktivierung der Hydrolase- und Depolymerasefunktion betrugen 360 krd bzw. 280 krd. Sie lagen damit erheblich unter den extrapolierten Werten, die sich aus der linearen Abhängigkeit der D_{37} von der Enzymkonzentration ergeben (21). Für die D_{37} wurden hieraus die Werte 500 krd für die Hydrolase und 400 krd für die Depolymerase errechnet. Außerdem ist also in diesem Fall die Depolymerasefunktion strahlenempfindlicher als die Hydrolasefunktion. Diese Werte basieren auf Messungen unter gleichen Versuchsbedingungen, außer daß an Stelle in 10^{-3} M in 10^{-2} M Phosphatpuffer bestrahlt wurde. Es liegt daher nahe, anzunehmen, daß die Pufferstärke Einfluß auf die Inaktivierung hat. Dosis-Effekt-Kurven bei Bestrahlung in 10^{-4} M Phosphatpuffer unter sonst gleichen Bedingungen bestätigen dies. Die D_{37} für die Hydrolase betrug 245 krd, für die Depolymerase 290 krd (31). Sie lagen also noch-

mals niedriger, die Hydrolase war hier ebenso strahlenempfindlicher.

Die denkbare Möglichkeit, daß beim Bestrahlen in Puffern höherer Ionenstärke ein Teil der Wasserradikale durch Reaktion mit der Phosphatgruppe des Puffers abgefangen wird und damit höhere Inaktivierungsdosen benötigt werden, läßt sich mittels reaktionskinetischer Überlegungen sicher ausschließen. Die Geschwindigkeitskonstanten für e_{aq}^- und $OH^\cdot$ für die Reaktion mit RNase bzw. PO_4^{3-} betragen:

$$k_{e^-} + RNase : 1,0 \cdot 10^{10} \quad M^{-1} \cdot s^{-1} \quad (32)$$

$$k_{e^-} + PO_4^{3-} : 4,2 \cdot 10^6 \quad " \quad (33)$$

$$k_{OH^\cdot} + RNase : 2,4 \cdot 10^{10} \quad " \quad (32)$$

$$k_{OH^\cdot} + PO_4^{3-} : < 5 \cdot 10^6 \quad " \quad (34)$$

Für kompetierende Radikal-Reaktionen erster Ordnung, wenn also ein Radikal gleichzeitig mehrere Reaktionsmöglichkeiten (in unserem Fall entweder mit RNase bzw. PO_4^{3-}) hat, läßt sich folgende Beziehung ermitteln (35) :

$$W_{R + RNase} = \frac{k_{R+RNase} [RNase]}{k_{R+RNase} [RNase] + k_{R+PO_4^{3-}} [PO_4^{3-}]}$$

Dabei sind: $W_{R + RNase}$: Wahrscheinlichkeit für die Reaktion des Radikals mit RNase

$k_{R+PO_4^{3-}}$, $k_{R+RNase}$: Geschwindigkeitskonstanten
der Reaktion des Radikals
mit PO_4^{3-} bzw. RNase

$[RNase]$, $[PO_4^{3-}]$: Konzentration von RNase bzw.
 PO_4^{3-} in M

Die Werte für RNase $22,05 \cdot 10^{-5}$ M (3 mg/ml) und die oben
angegebenen Werte für die Geschwindigkeitskonstanten des
solvatisierten Elektrons eingesetzt in diese Gleichung
ergeben bei Variation von $[PO_4^{3-}]$ folgende Wahr-
scheinlichkeiten $W_{e^- + RNase}$:

$[PO_4^{3-}]$	$= 10^{-2}$	M	:	$W_{e^- + RNase}$	$= 0,981$
"	$= 10^{-3}$	M	:	"	$= 0,998$
"	$= 10^{-4}$	M	:	"	$= 0,999$

d.h. in 10^{-2} M Phosphatpuffer reagieren 98,1% der Elek-
tronen mit RNase, in 10^{-3} M 99,8% und in 10^{-4} M 99,9%.
Für die Reaktionswahrscheinlichkeit von $OH^\cdot$ -Radikalen
mit RNase ergeben sich unter diesen Bedingungen noch
geringere Unterschiede, da $k_{OH^\cdot + RNase} > k_{e^- + RNase}$
und $k_{OH^\cdot + PO_4^{3-}} \approx k_{e^- + PO_4^{3-}}$.

Es ist damit sicher, daß bei den verglichenen Puffer-
stärken ein Wegfangen von Radikalen durch Reaktion
mit Pufferionen keinen Einfluß auf die unterschied-
lichen Inaktivierungsdosen haben kann. Erst bei Be-
strahlung in 10^{-1} M Phosphatpuffer würde unter diesen
Bedingungen ein nennenswerter Teil der erzeugten Elek-

tronen (18%) mit Ionen reagieren. Neuere pulsradiolytische Messungen ergaben allerdings, daß $k_{e-} + \text{RNase}$ von der Ionenstärke des Puffers abhing, in dem RNase gelöst war. Es war $k_{e-} + \text{RNase} = 8 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ bei Bestrahlung in 10^{-3} M Phosphatpuffer und $3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ in 10^{-4} M Phosphatpuffer. Darüber hinaus waren die Geschwindigkeitskonstanten für bereits bestrahlte RNase höher als für native und waren dann in 10^{-4} M sogar 8mal größer als in 10^{-3} M Phosphatpuffer (36). Für die zur Inaktivierung wichtigeren $\text{OH}^\bullet$ - und $\text{H}^\bullet$ - Radikale liegen derartige Messungen noch nicht vor. Aber es wäre denkbar, daß es für sie ähnliche Unterschiede der Geschwindigkeitskonstanten bei den verschiedenen Ionenstärken gibt. Bei Bestrahlung von wässrigen Enzymlösungen wird immer ein Teil der gebildeten Wasserradikale durch Verunreinigungen ("Dreck") abgefangen. Für den Fall höherer Geschwindigkeitskonstanten der Radikale für die Reaktion mit RNase in "dünnere" Puffern wird somit der Anteil der Radikale, die infolge dieser Reaktion für die Enzyminaktivierung entfallen, abnehmen, so daß sich deshalb in "dünnere" Puffern niedrigere Inaktivierungsdosen ergeben sollten. Eine andere mögliche Erklärung wäre, daß die räumliche Struktur, in der das native Enzym in Lösung vorliegt, von der Ionenstärke des Puffers abhängt.

2. Wie in 3.1.2. bereits angedeutet, verläuft die Kurve für die Inaktivierung der Hydrolasefunktion nur bis zu einer Dosis von 230 krd exponentiell und biegt dann ab, so daß die Aktivitätsabnahme/Dosiseinheit geringer wird. Eine Erklärung wäre die Annahme einer mit der Dosis abnehmenden Empfindlichkeit der RNase-Moleküle gegenüber ionisierenden Strahlen. Man kann dann für die formale Beschreibung von Dosis-Effekt-Kurven folgenden Ansatz machen:

$$\frac{d \frac{A}{A_0}}{d D} = - R(D) \cdot \frac{A}{A_0}$$

Dabei sind:

- A : enzymatische Aktivität in % bei der Dosis D
- A₀ : Aktivität des unbestrahlten Enzyms
- D : Dosis
- R(D) : Tangentenneigung der Dosis-Effekt-Kurve bei der Dosis D

Durch Integration ergibt sich:

$$\ln \frac{A}{A_0} = - \int_0^D R(D) \cdot dD + C$$

$$C = 0, \text{ da für } D = 0 \ln \frac{A}{A_0} = 0$$

Für den Fall, daß $R = \text{const.}$ also die Empfindlichkeit der bestrahlten Objekte von der Dosis unabhängig ist, ergibt sich eine Exponentialkurve der üblichen Form:

$$A = A_0 \cdot e^{-RD}$$

Ist jedoch $R = R(D)$, so ergeben sich Dosis-Effekt-Kurven, die mit steigender Dosis flacher verlaufen, falls $R(D)$ mit zunehmender Dosis kleiner wird. Bei Übertragung dieses Gedankenganges auf das vorliegende Problem kommt nur in Betracht, daß die Moleküle des Aggregats in bezug auf die Hydrolasefunktion strahlenresistenter sind als die nativen bzw. die der Gruppe I. Da es mit zunehmender Dosis zu einer Zunahme von Aggregat zu Lasten der Gruppe I kommt, resultiert daraus eine Abnahme der Strahlenempfindlichkeit. Man erhält dann gekrümmte Kurven. Die zweite Bedingung ist, da man diesen Effekt bei noch relativ hoch verbliebener enzymatischer Aktivität beobachtet, eine hohe Hydrolaseaktivität im Aggregat. Dies konnte bei der Messung der Aktivitätsverteilung bestätigt werden. Für

diese Annahme spricht daher auch, daß die Depolymerasefunktion bei höheren Dosen gleichbleibende Strahlenempfindlichkeit wie zu Beginn der Bestrahlung aufweist. Gleichzeitig fand man keine aggregierten und offenbar strahlenresistenteren Moleküle, die Depolymeraseaktivität aufweisen.

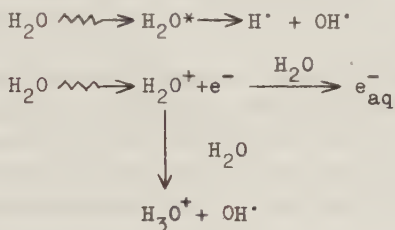
Auch andere Autoren fanden, daß im Aggregat die Aktivität der Hydrolase noch hoch, die der Depolymerase dagegen niedrig ist (20). Es ist nicht bekannt, ob die beiden enzymatischen Funktionen der RNase von zwei verschiedenen aktiven Zentren katalysiert werden. Selbst wenn dies der Fall ist, erscheint es als unwahrscheinlich, daß sie bei einer angenommenen statistischen Verteilung der Radikalreaktionen über das ganze Molekül unterschiedlich strahlensensibel sind. Im Aggregat liegen die Moleküle zum Teil sicher in veränderter Konformation vor, so daß folgender Mechanismus denkbar ist: CCP, das Substratmolekül zur Bestimmung der Hydrolase, kann wegen seiner geringen Molekülgröße nach wie vor mit dem aktiven Zentrum reagieren, während für RNS als Makromolekül infolge dieser räumlichen Strukturveränderung ein großer Teil der aktiven Zentren blockiert ist, so daß man praktisch keine Depolymeraseaktivität mißt.

Für die Moleküle der Gruppe I konnte gezeigt werden, daß auch sie teilweise inaktiviert werden, ohne daß es zu einer Molekülvergrößerung kommt. Aminosäureanalysen der einzelnen Peaks, die man bei Gelchromatographie bestrahlter RNase erhält, ergaben, daß in allen Peaks in gleicher Weise einige Aminosäuren selektiv zerstört werden (37). Da in Aggregat aber beide Aktivitäten gegenüber Gruppe I vermindert sind, muß hier ein zusätzlicher Vorgang zur Inaktivierung beitragen. In Frage kommt wieder eine Konformationsänderung der Moleküle bedingt durch Vorgänge im Sinne

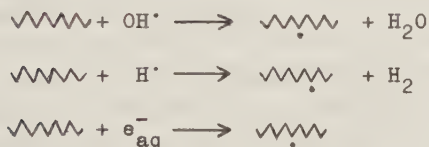
einer Entfaltung, Neubildung von Disulfidbrücken, Brüchen in der Peptidkette oder Anlagerung von kleinen Bruchstücken.

Für die Mechanismen, die bei Bestrahlung von RNase ablaufen, ist folgendes Schema denkbar:

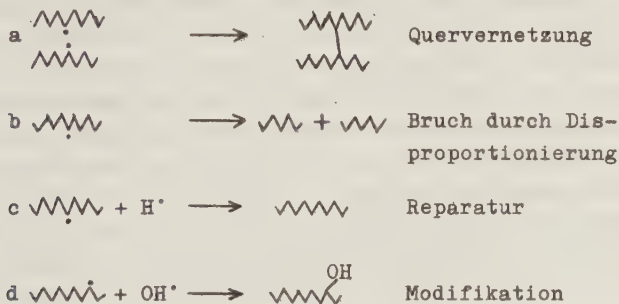
(1) Wasserradiolyse



(2) Reaktion der Radikale mit Enzymmolekülen



(3) Folgereaktionen der Enzymradikale aus (2)



Nach der Radiolyse des Wassers kommt es zu Radikal-Enzym-Reaktionen mit Bildung von Radikalstellen an den Enzymmolekülen. Diese könnten dann weiter nach den unter (3) angegebenen Möglichkeiten reagieren. Komplizierend käme hinzu, daß die unter (3) entstandenen Produkte bei weiterer Bestrahlung wieder gemäß (2) weiterreagieren könnten und anschließend die Reaktionsmöglichkeiten von (3) durchlaufen würden usw. Es würde also nach diesem theoretischen Schema eine Vielzahl von verschiedenen Molekülen entstehen.

Bei Bestrahlung von RNase-Lösungen gleicher Konzentration mit verschiedenen Dosen ergab sich, daß mit zunehmender Dosis die Aggregationsbeute steigt. Dieses Ergebnis korreliert auch mit dem angegebenen Reaktionsschema, weil mit steigender Dosis die Radikalausbeute steigt und damit die Anzahl der Reaktionen nach (2) und (3) zunehmen sollte.

Bei Bestrahlung von Lösungen unterschiedlicher Enzymkonzentration mit Dosen, die zu gleichem Inaktivierungsgrad führten, ergab sich, daß die Ausbeute an Aggregat bei den verschiedenen Konzentrationen gleich war.

Man kann annehmen, daß ähnlich wie bei der Enzyminaktivierung (G-Wert* konzentrationsunabhängig) die Anzahl der Enzymradikale pro Dosis unabhängig von der Anfangskonzentration der Enzyme ist. Daher muß die momentane Konzentration an Enzymradikalen in verdünnten oder konzentrierten Proteinlösung gleich hoch sein, da sie nur bestimmt ist von der Menge der Primärradikale. Nimmt man weiterhin an, daß ein gleichbleibender Anteil der gebildeten Enzymradikale nach 3(a) auf Grund von Quervernetzungen Aggregate bildet, dann muß die Ausbeute an Aggregat pro Dosis unabhängig von der Enzymkonzentration sein.

* G-Wert = veränderte Moleküle/100 eV

Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu der Arbeit von Delincee und Radola, die für höhere Konzentrationen stärkere Aggregation gefunden hatten (22). Dazu ist zu sagen, daß diese Autoren keine Aktivitätsbestimmungen durchgeführt hatten, sondern sich auf die Gültigkeit des Verdünnungseffektes verließen. Er besagt, daß man bei einer n-fachen konzentrierteren Lösung gleichen Inaktivierungsgrad erhält, wenn man mit der n-fachen Dosis bestrahlt (9). So bestrahlten diese Autoren eine 0,1%ige RNase-Lösung mit 0,2 Mrd und eine 1%ige mit 2 Mrd und nahmen an, daß damit in beiden Fällen die verbliebene Enzymaktivität gleich hoch ist. Bei Gelchromatographie der 10-fach konzentrierteren Lösung fanden sie dann eine höhere Aggregatausbeute. In der hier vorliegenden Arbeit wurden vorher für die Hydro-lasfunktion Dosis-Effekt-Kurven gemessen und dann eine lineare Abhängigkeit der D_{37} von der Enzymkonzentration mittels einer linearen Regressionsmethode ermittelt. Es ergaben sich rechnerisch die Werte $m = 109,6 \left[\frac{\text{krd} \cdot \text{ml}}{\text{mg}} \right]$ und $b = [8,3] \text{ krd}$ für die Gerade

$$D_{37} (c) = m \cdot c + b$$

Nimmt man an, daß dieser lineare Zusammenhang auch noch bei höheren Enzymkonzentrationen besteht, dann folgt aus diesen Werten:

$c \text{ (mg/ml)}$	$D_{37} \text{ (krd)}$
1	118
10	1104

$$\frac{D_{37} (10)}{D_{37} (1)} = 9,4$$

d.h. für die gleiche Inaktivierung einer 10fach konzentrierteren Lösung benötigt man in diesem Fall nur die 9,4fache Dosis. Diese Messungen wurden bei Bestrahlung unter N_2O und in 10^{-3} M Phosphatpuffer durchgeführt. Delincee und Radola

hatten in 10^{-2} M Phosphatpuffer unter Argon (entspricht N_2) bestrahlt. Für diese Bedingungen ist in der Arbeit von Schüssler (21) ein linearer Zusammenhang zwischen der D_{37} und der Enzymkonzentration angegeben. Führt man mittels der dort veröffentlichten Daten die gleiche Extrapolation durch, ergeben sich folgende Relationen:

$$\begin{array}{lcl} \text{Hydrolase} & : & \frac{D_{37}(10)}{D_{37}(1)} = 5,1 \\ \text{Depolymerase} & : & " = 3,0 \end{array}$$

d.h. es sind nicht 10-fache Dosen zur gleichen Inaktivierung nötig sondern 3-5-fache. Auch hier gilt der Verdünnungseffekt nicht. Es erscheint als sehr wahrscheinlich, daß Delincee und Radola mit einer zu hohen Dosis bestrahlten, die konzentriertere Lösung damit stärker inaktivierten und folglich höhere Aggregatausbeute erhielten.

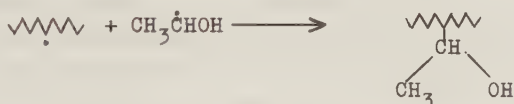
Bei Bestrahlung von RNase-Lösungen unterschiedlicher Konzentration mit gleicher Dosis war die Aggregation umgekehrt proportional der Enzymkonzentration. Entsprechend der Annahme auf Seite 56 werden bei gleicher Dosis unabhängig von der Enzymkonzentration gleich viele Enzymradikale gebildet. Das bedeutet, daß in verdünnten Lösungen prozentual mehr Enzymradikale und folglich auch mehr Aggregat entsteht als in den konzentrierten Lösungen. Obgleich das hier angegebene Reaktionsschema die Aggregation der RNase recht gut erklärt, gilt es aber offenbar nicht für alle Enzyme. Niemczyk und Kunigk hatten bei Bestrahlung von LDH ein konträres Ergebnis gefunden, derart, daß im Gegensatz zu RNase mit steigender Enzymkonzentration die Aggregation stieg (8,17).

Im angegebenen Reaktionsschema ist in 3 (a) die Möglichkeit der intermolekularen Vernetzung zwischen zwei Molekülen mit Radikalstellen angegeben. Verschiedene Versuchsergebnisse machen diese Annahme wahrscheinlich. Bei Anwe-

senheit von O_2 während der Bestrahlung verringert sich die Ausbeute von dimerer RNase (37). Das zeigt, daß bei der Entstehung von Vernetzungen in bestrahlter RNase freie Radikale beteiligt sind. Diese können mit O_2 unter Bildung von Peroxyradikalen reagieren,



wodurch ein Teil der Vernetzungen nach 3 (a) verhindert wird. Auch bei der Radiolyse von RNase in Gegenwart von Äthanol wird die Bildung von Aggregat verhindert. Es konnte experimentell unter Verwendung von ^{14}C -Äthanol gezeigt werden, daß Äthanolradikale entsprechend



reagieren, wodurch die Vernetzungen der Enzymmoleküle unterbleiben (38).

Bei Bestrahlung von Makromolekülen in wässriger Lösung ist die Situation sehr komplex. Die Vernetzungsrate wird durch zahlreiche Parameter beeinflusst wie Größe, Konformation und Konzentration der Makromoleküle, Ionenstärke des Lösungsmittels, polare Effekte usw. (9). Es existieren jedoch darüber in der Literatur keine detaillierten Angaben, so daß der Unterschied zwischen RNase und LDH mit den verfügbaren Informationen nicht erklärbar ist. Strahlenchemische Untersuchungen an synthetischen Makromolekülen (z.B. Polyvinylchlorid) ergaben, daß eine optimale Konzentration für die Erzeugung von Vernetzungen existiert. Trägt man die Vernetzungsrate gegenüber der Konzentration auf, so ergibt sich folgendes Bild: zu höheren Konzentrationen hin nimmt die Vernetzungsrate pro Dosiseinheit ab und nähert sich dem nach Bestrahlung im

Trockenen beobachteten Wert. Nach kleineren Konzentrationen hin nimmt die Häufigkeit der Vernetzungen ebenfalls ab, bis unterhalb einer kritischen Konzentration überhaupt keine Vernetzungen mehr nachzuweisen sind. Den Scheitelpunkt (Maximum) dieser "parabelähnlichen" Kurve bildet die optimale Konzentration für Vernetzungen (35). Es wäre denkbar, daß für die Bestrahlung von LDH der linke Schenkel (positive Steigung) der Kurve gilt, für die Bestrahlung von RNase der rechte (negative Steigung). Diese Annahme ist jedoch rein spekulativ und bedürfte noch kausaler Erklärung.

Die Auftrennungen der Aggregate der RNase über G-200 ergaben, daß sie sich aus einem Gemisch von Teilchen unterschiedlichen Molekülvolumens zusammensetzen und nicht aus ganzzahligen Vielfachen monomerer RNase. Dieses Ergebnis korreliert wieder gut mit dem angegebenen Reaktionsschema, das zu einer großen Zahl unterschiedlicher Molekülgrößen führt.

Bei Bestrahlung von RNase und anschließender Gelchromatographie lassen sich somit drei Peaks unterscheiden: uneinheitliches Aggregat (III), Dimeres (II) und größtmäßig unveränderte Moleküle (I). Zu gleichen Ergebnissen kamen Delincee und Radola (22). Auch sie fanden bei Dünnschichtchromatographie auf G-75 für das Aggregat keine scharfe, sondern eine verschmierte (smearing) breite Bande, was auf uneinheitliche Aggregatzusammensetzung hinweist. Ein gleiches Ergebnis fanden diese Autoren bei Bestrahlung von Meerrettich-Peroxidase und anschließender Dünnschichtchromatographie auf G-200. Das Aggregat erwies sich als diffuse breite Bande mit einem scheinbaren MG-Bereich von 40 000 - 500 000 (39). Weder bei diesen Autoren noch in der hier vorliegenden Arbeit trat ein vierter Peak auf, den Mee et al. fanden und als denaturierte RNase bezeichneten (7). Außerdem war bei ihnen die Aggregatausbeute bei gleicher Dosis weitaus höher. Führt man aber die Elution nicht mit Puffer sondern mit HCl durch

(so eluierten diese Autoren), so erhält man diese veränderten Ergebnisse (s. Abb. 14). Es ist damit sicher, daß sich infolge des niedrigen pH's bei der Elution sekundäre Größenveränderungen der durch Bestrahlung geschädigten RNase-Moleküle ergeben, die mit der Größenveränderung infolge Bestrahlung ursächlich nicht in Zusammenhang stehen.

Kleinmolekulare Bestandteile, kleiner als Monomeres, wie sie Niemczyk bei Bestrahlung von LDH fand (17), traten nicht auf. Das beweist allerdings nicht, daß sie im Aggregat nicht vorkommen können. Im Gegensatz zu LDH, die kein Cystin enthält, besitzt das RNase-Molekül vier Disulfidbrücken. Bei einem Bruch in der Peptidkette kommt es daher nur dann zu einer Freisetzung der Bruchstücke, wenn er vor der ersten oder nach der letzten S-S-Brücke liegt oder zwei Brücke zwischen zwei S-S-Brücken erfolgen. Aus diesem Grund sollten bei RNase erheblich weniger Bruchstücke entstehen als bei LDH. Darüberhinaus ist es möglich, daß entstandene Bruchstücke über hydrophobe oder elektrostatische Bindungen oder auch infolge von Radikalreaktionen im Sinne von Quervernetzungen Anschluß an das Aggregat finden und damit ohne weitere Behandlung bei der Gelchromatographie nicht nachweisbar sind.

Nach Reduktion von trocken bestrahlter RNase mit Merkaptoäthanol, wodurch S-S-Brücken gespalten werden, und anschließender Alkylierung wurden Bruchstücke gefunden. Ihr Anteil schwankte je nach Versuchsbedingungen zwischen 5% (23) und höchstens 50% (19).

Über die Mechanismen, die zur Inaktivierung und Aggregation von RNase führen, ist bisher wenig bekannt. Nach Ray und Hutchinson (23) erfolgt die Inaktivierung durch Disorganisation der Polypeptidketten. Als Beweis für die Konformationsänderung geben sie stark verändertes physikalisches und chemisches Verhalten an, wie z.B. Änderung von UV-Spektren, Erhöhung der Reaktionsbereitschaft von S-S-Gruppen, Änderung der optischen Rotation usw. Die Konformation kann

geändert sein durch Brüche in der Hauptkette, Bruch von S-S-Brücken und durch Aggregation. Der zweite Faktor für die Inaktivierung sollen Änderungen in den Seitenketten infolge von Radikalreaktionen sein. Delincee und Radola fanden nach Bestrahlung von 1%iger RNase-Lösung mit 1 Mrd und anschließender Reduktion und Alkylierung ebenso kleinere Bruchstücke, die ca. 7% der Gesamtproteine ausmachten (22). Das weist auf Brüche in der Peptidkette und auf die Existenz von S-S-Brücken im Aggregat hin. Nach diesen Autoren sind auch nicht kovalente Bindungen im Aggregat vorhanden, da sich bei wiederholter Chromatographie des isolierten Aggregates eine spontane Dissoziation ergab. Für Bestrahlung von Meerrettich-Peroxidase geben Delincee und Radola (39) ähnliche Mechanismen wie Ray und Hutchinson für RNase an. Der Hauptgrund für die Inaktivierung soll eine allgemeine Konformationsänderung sein, entweder bedingt durch Angriffe der Radikale an den Seitenketten oder durch eine allgemeine Disorganisation der Sekundär- und Tertiärstruktur. Bruchstücke, kleiner als das Monomere, wurden nicht beobachtet, auch nicht nach Reduktion. Eine teilweise Dissoziation der Aggregate konnte durch Reduktion mit Merkaptoäthanol herbeigeführt werden, was auf S-S-Bindungen im Aggregat schließen läßt. Bei Behandlung mit Harnstoff, Guanidin-HCl oder Dodecylsulfat - Substanzen, die hydrophobe, elektrostatische Bindungen und H-Brücken spalten - ließen sich die Aggregate nicht weiter auftrennen, so daß auch kovalente Bindungen im Aggregat vorhanden sein müssen. Für die Aggregation bei diesem Enzym vermuten sie folgenden Mechanismus:

Monomer $\longrightarrow$ Dimer $\longrightarrow$ Aggregate $\longrightarrow$ inaktive Aggregate

Die enzymatisch aktiven Aggregate werden von Monomeren gebildet, wahrscheinlich über Dimere reagieren sie zu höheren Aggregaten, die gleichzeitig durch die Strahlung inaktiviert werden. Gleichzeitig soll der Prozeß:

Monomeres $\longrightarrow$ inaktives Monomeres

ablaufen, da Delincee und Radola wie bei RNase auch für Peroxidase eine Abnahme der Aggregation bei verdünnten Lösungen bei gleicher Inaktivierung fanden. Dies konnte in der hier vorliegenden Arbeit für RNase allerdings nicht bestätigt werden.

Bei bestrahlten RNase-Lösungen zeigte sich nach Bestrahlungsende eine weitere Zunahme von E_{278} , die zeit- und temperaturabhängig war. UV-Spektren ergaben in Abhängigkeit von der Zeit eine allgemeine Extinktionszunahme. Die UV-Spektren änderten sich ebenfalls zeitabhängig, wie genau in 3.2.3.2. beschrieben.

Bezüglich der Deutung von Differenzspektren bestrahlter RNase besteht Einigkeit zwischen den einzelnen Autoren, was den Kurvenverlauf betrifft. Man vermutet, daß es zu einer Modifikation der Tyrosingruppen oder ihrer unmittelbaren Umgebung kommt (23, 24, 40). Differenzspektren von bestrahlten und anschließend hydrolisierten RNase- und Tyrosinlösungen sind fast völlig identisch (40). Die allgemeine Extinktionserhöhung bedarf noch genauer Erklärung. Smith und Adelstein (40) halten es für möglich, daß es infolge von Radikalreaktionen mit Tyrosin zur Bildung von neuen chromophoren Gruppen kommt. Sie begründen das damit, daß auch bestrahlte Tyrosinlösungen eine allgemeine Extinktionszunahme aufweisen.

Nach Ray und Hutchinson hat die Aggregation zumindest einen Teileinfluß auf die Extinktionserhöhung und auf Differenzspektren (23). Delincee und Radola fanden für Bestrahlung von Meerrettich-Peroxidase, daß die allgemeine Extinktionszunahme höher ist als der Betrag an Streulicht, der durch die Aggregate entsteht und der sich mittels des Rayleigh'schen Gesetzes berechnen läßt (39). Diese bis jetzt verfügbaren Informationen reichen nicht aus, um die Vorgänge nach dem Bestrahlen bei der bestrahlten RNase-Lösung - weitere allgemeine Extinktions-

erhöhung, Modifikation des Differenzspektrums - zu erklären. Insbesondere bleibt die Frage offen, ob es sich dabei um eine weitere Aggregation handelt.

Mittels dreier Chromatogramme (siehe 3.2.3.3.) konnte gezeigt werden, daß das Elutionsergebnis unabhängig von Zeitpunkt des Auftrages auf die Säule ist, so daß diese Vorgänge auf jeden Fall reversibler Natur sind. Wegen der Temperaturabhängigkeit wäre denkbar, daß es sich um reversible Konformationsänderungen des Enzyms handelt.

Die Aggregation ist ein interessantes Phänomen, das bei bisher allen bestrahlten Enzymen auftrat. Die in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen an RNase können nur einen ersten Einblick in die dabei ablaufenden Mechanismen gewähren. In Fortführung dieser Arbeit müßten sich nun Untersuchungen zur genauen Identifizierung des Aggregates anschließen, etwa in Bezug auf vorliegende Bindungen, das Vorliegen von Bruchstücken usw. Dadurch sollte es möglich sein, weitergehende Einblicke in die Reaktionsmechanismen, die zur Aggregation führen, zu gewinnen.

5. Zusammenfassung

RNase wurde in 10^{-3} M Phosphatpuffer, pH 7,0 unter N_2 und N_2O durch Röntgenstrahlung inaktiviert. Die gebildeten Produkte wurden auf Menge, Größe und enzymatische Aktivität in Abhängigkeit von der Dosis und Enzymkonzentration untersucht.

Die Werte für die D_{37} für die Inaktivierung waren von der Ionenstärke des Puffers, in dem RNase gelöst war, abhängig. In Puffern niedrigerer Ionenstärke benötigt man geringere Inaktivierungsdosen. Die Hydrolaseaktivität war mit steigender applizierter Dosis strahlenunempfindlicher. Mittels Gelchromatographie ließen sich drei Fraktionen unterschiedlicher Molekülgröße unterscheiden. Bruchstücke, kleiner als native RNase, wurden nicht gefunden. Im Aggregat war die Hydrolaseaktivität noch relativ hoch, die Depolymeraseaktivität dagegen sehr gering. Die Aggregatausbeute und die Molekülgröße der Teilchen im Aggregat nahm bei konstanter Enzymkonzentration mit der Dosis zu. Bei Bestrahlung von Lösungen unterschiedlicher Konzentration mit der gleichen Dosis wurde in dünneren Lösungen mehr Aggregat gefunden. Bei gleicher Inaktivierung ergab sich eine von der Konzentration unabhängige Aggregatausbeute. Mittels Gelchromatographie über G-200 konnte gezeigt werden, daß sich das Aggregat aus Teilchen unterschiedlicher Molekülgröße und nicht aus Vielfachen monomerer RNase zusammensetzt. Bei Elution mit 10^{-2} N HCl wächst die Aggregatausbeute und seine Molekülgröße. Es handelt sich dabei um sekundäre Vorgänge infolge des niedrigen pH's. Auch nach Bestrahlungsende spielen sich "Reaktionen" ab, die zu einer weiteren Extinktionserhöhung und Änderung der Differenzspektren der bestrahlten RNase-Lösung führen. Sie sind jedoch reversibler Natur.

6. Literaturverzeichnis

1. M. Ebert, J. P. Keene, A. J. Swallow, J. H. Baxendale, Pulse Radiolysis, London: Academic Press (1965)
2. C. H. W. Hirs, S. Moore, W. H. Stein, J. biol. Chem. 235, 633 (1960)
3. D. H. Spackmann, W. H. Stein, S. Moore, J. biol. Chem. 235, 648 (1960)
4. G. Kartha, J. Bello, D. Harker, Nature 213, 862 (1967)
5. H. A. Scheraga, J. A. Rupley, Adv. Enzymology 24, 162 (1962)
6. H. Jung, H. Schüssler, Z. Naturforsch. 21 b, 224 (1966)
7. L. K. Mee, S. J. Adelstein, G. Stein, Radiat. Res. 52, 588 (1972)
8. K. Kunigk, Dissertation, Erlangen (1973)
9. H. Dertinger, H. Jung, Molekulare Strahlenbiologie, Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag (1969)
10. F. S. Dainton, D. B. Peterson, Proc. Roy. Soc. 267 A, 443 (1962)
11. Th. Zahn, Dissertation, Erlangen (1976)
12. M. Kunitz, J. biol. Chem. 164, 563 (1946)
13. J. T. Potts, D. M. Young, C. B. Anfinsen, A. Sandoval, J. biol. Chem. 239, 3781 (1964)

14. F. M. Richards, P. J. Vitahayathil, J. biol. Chem. 234, 1259 (1959)
15. Informationsschrift, "Sephadex-Gelfiltration in Theorie und Praxis", Pharmacia, Uppsala (1969)
16. H. Determann, Gelchromatographie, Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag (1967)
17. P. Niemczyk, Dissertation, Erlangen (1974)
18. C. P. Denkl, Dissertation, Erlangen (1971)
19. J. S. Haskill, J. W. Hunt, Radiat. Res. 32, 827 (1967)
20. H. Schüssler, J. Int. Radiat. Biol. 23, 175 (1973)
21. H. Schüssler, Habilitationsschrift, Erlangen (1976)
22. H. Delincee, B. J. Radola, Int. J. Radiat. Biol. 28, 565 (1975)
23. D. K. Ray, F. Hutchinson, Biochim. Biophys. Acta 147, 357 (1967)
24. S. Aktipis, A. J. Iammartino, Biochim. Biophys. Acta 278, 239 (1972)
25. H. A. Scheraga in Proteine Structure, New York-London, Academic Press (1961)
26. J. W. Donovan, M. Laskowski, H. A. Scheraga, J. Amer. Chem. Soc. 83, 2686 (1961)
27. D. B. Wetlaufer, Adv. Prot. Chem. 17, 303 (1961)

28. F. H. White, J. biol. Chem. 236, 1353 (1961)
29. C. Tanford, J. D. Hausenstein, D. G. Rands, J. Amer. Chem. Soc. 77, 6409 (1955)
30. D. Shugar, Biochem. J. 52, 142 (1952)
31. H. Schüssler, unveröffentlicht
32. N. N. Lichtin, J. Ogdan, G. Stein, Biochim. Biophys. Acta 267, 124 (1972)
33. M. Anbar, E. J. Hart, Adv. chem. Ser. 81, 79 (1968)
34. R. Braams, M. Ebert, Adv. chem. Ser. 81, 464 (1968)
35. A. Henglein, "Einführung in die Strahlenchemie", Weinheim/Bergstraße, Verlag Chemie (1969)
36. M. Ebert, V. Davies, H. Schüssler, unveröffentlicht
37. H. Jung, H. Schüssler, Z. Naturforsch. 22 b, 614 (1967)
38. H. Schüssler, L. K. Mee, S. J. Adelstein, Int. J. Radiat. Biol., im Druck
39. H. Delincee, B. J. Radola, Radiat. Res. 58, 9 (1974)
40. T. W. Smith, S. J. Adelstein, Radiat. Res. 24, 119 (1965)

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Pauly danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige materielle Unterstützung von seiten des Instituts.

Frau Dr. H. Schüssler bin ich besonders dankbar für ihre wissenschaftliche Anleitung, ihre praktische Unterstützung und ihren persönlichen Einsatz für diese Arbeit.

Mein Dank gilt auch Frau E. Dachs für die Schreibarbeit und die Hilfe beim Anfertigen der Zeichnungen.

Ferner möchte ich an dieser Stelle besonders meinen Eltern danken, die mir den Besuch der Universität ermöglichten.

Lebenslauf

Am 2. Juni 1949 wurde ich, Winfried Hierl, Sohn von Rektor Georg Hierl und seiner Ehefrau Agnes, geb. Karl, in Weiden / Oberpfalz geboren.

Von 1955 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Weiden. Im gleichen Jahr trat ich in das naturwissenschaftliche Kepler-Gymnasium in Weiden ein. 1968 legte ich dort das Abitur ab.

Anschließend studierte ich zwei Semester Elektrotechnik an der TU München. Das Studium der Medizin begann ich im Wintersemester 1969/70 an der Universität Erlangen-Nürnberg; Im Frühjahr 1976 schloß ich es mit dem Staatsexamen ab.

Erlangen, im September 1976

Winfried Sigmund Ernst Hierl

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogt, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990